

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Bioteekniikka

2013

Milla Högmander

# BAKTEERIEN KVANTITOINTIMENETELMÄN KEHITTÄMINEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Milla Högmander

# BAKTEERIEEN KVANTITOINTIMENETELMÄN KEHITTÄMINEN

Bakteerien kvantitointi on nykyään monessa yhteydessä tärkeää, kuten hygieniamäärityksissä ja lääkekehityksessä. Saatavilla on monia kaupallisia menetelmiä, joiden ominaisuudet vaihtelevat. Osa menetelmistä käyttää monimutkaista tai kallista teknologiaa. Toiset menetelmät ovat teknisesti yksinkertaisia, mutta ne voivat käsittää useampia työvaiheita ja viedä aikaa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää yksinkertainen, nopea ja edullinen menetelmä bakteerien kvantitoimiseen. Lisäksi tavoitteena oli, että menetelmällä voitaisiin havaita niin elävät kuin kuolleetkin solut.

Menetelmä perustuu fluoresenssin lähteenä käytettävän lantanidikelaatin epäspesifiseen vuorovaikutukseen bakteerien kanssa ja aikaerotteiseen luminesenssiin. Menetelmässä lantanidiin sitoutuneet ligandit viritetään ja siirtävät aktivaatioenergiaa lantanidille, jonka fluoresenssia mitataan. Bakteerien lukumäärän kasvu havaitaan signaalin muutoksena. Menetelmän optimoinnissa havainnoitiin erilaisten olosuhteiden vaikutusta signaaliin, sen stabiilisuuteen ja menetelmän herkkyyteen. Tutkittavia olosuhteita olivat muun muassa kelaatin koostumus ja sen pitoisuus, haihdutus, näytepuskurit sekä mediumpitoisuus.

Menetelmällä pystyttiin havaitsemaan Gram-negatiivisia ja -positiivisia bakteereita sekä eläviä ja kuolleita soluja. Menetelmän herkkyydeksi määritettiin 600 – 5 000 bakteeria, näytetilavuudesta riippuen. Menetelmän herkkyys ei riitä herkimpien kaupallisten kvantitointimenetelmien tasolle, mutta se soveltuu käytettäväksi esimerkiksi korvaamaan absorbanssimittaukset suurien bakteerimäärien seuraamiseen.

## ASIASANAT:

aikaerotteinen luminesenssi, epäspesifinen sitoutuminen, kvantitatiivinen analyysi, lantanidikelaatti

Milla Högmander

## DEVELOPMENT OF METHOD FOR BACTERIAL QUANTIFICATION

Nowadays bacterial quantification is important for several different purposes, such as hygiene and drug development. There are several commercial quantification kits available, with varying properties. Some of the methods utilize complex, expensive technology. Other methods are technically simple but may consist of several assay steps and therefore be time-consuming.

The objective of the thesis was to develop a simple, quick, and inexpensive method for quantification of bacteria. In addition, the aim was to develop a method capable of detecting both living and dead bacterial cells.

The method is based on non-specific interaction of fluorescent lanthanide chelate with bacteria and time-resolved luminescence. In the method, ligands bound to the lanthanide ion are excited and transfer activation energy to the lanthanide, whose fluorescence is measured. The increase of the number of bacteria in a sample is detected as a change in the fluorescence signal. The method was optimized by detecting the effects of different conditions on the fluorescence signal, its stability, and sensitivity. The observed conditions included composition of the chelate and its concentration, evaporation of the sample, buffers, and concentration of the medium in the sample.

Changes in the concentration of Gram-negative and Gram-positive bacteria and dead or living cells were successfully detected by the developed method. The sensitivity of the method was from 600 to 5 000 bacteria depending on the sample volume. The sensitivity of the method does not reach that of the most sensitive commercial quantitation methods. Despite that it may replace the absorbance measurement in assessing the concentration of bacterial cultures.

### KEYWORDS:

time-resolved luminescence, non-specific binding, lanthanide chelate, quantitative analysis

# SISÄLTÖ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)</b>                        | <b>7</b>  |
| <b>1 JOHDANTO</b>  | <b>8</b>  |
| <b>2 LUMINESENSSI</b>  | <b>9</b>  |
| 2.1 Fluoresenssi   | 10        |
| 2.2 Fosforesenssi  | 10        |
| 2.3 Viivästynyt fluoresenssi                                   | 11        |
| 2.4 Fluorokromit   | 11        |
| 2.5 Aikaerotteinen fluorometria                                | 12        |
| <b>3 BAKTEERIEN JAOTTELU SOLUSEINÄN RAKENTEEN PERUSTEELLA</b>  | <b>14</b> |
| <b>4 KVANTITOINTIMENETELMIÄ</b>                                | <b>16</b> |
| 4.1 Maljaus ja mikroskopia                                     | 16        |
| 4.2 Sameusmittaus  | 17        |
| 4.3 Coulterin laskija  | 17        |
| 4.4 DNA-määritykset  | 18        |
| 4.5 ATP-määritys   | 19        |
| <b>5 MENETELMÄT JA MATERIAALIT</b>                             | <b>21</b> |
| 5.1 Bakteerien esikäsittely                                    | 21        |
| 5.2 Kuolleiden bakteerien vaikutus signaaliin                  | 22        |
| 5.3 Näytteiden valmistus                                       | 22        |
| 5.3.1 Kelaattien valmistus                                     | 23        |
| 5.3.2 Haihdutus  | 25        |
| 5.3.3 Kuoppalevyt ja mikrosentrifugiputket                     | 25        |
| 5.3.4 Näytepuskurit ja suolanlisäys                            | 26        |
| 5.3.5 Fosfaatin lisäyksen optimointi                           | 26        |
| 5.3.6 Liuotinten lisäys sekä Eu/NTA/TOPO:n lisäys liuottimissa | 27        |
| 5.3.7 Mediumin sieto   | 27        |
| 5.4 Kelaatin sitoutumistavan määritys                          | 27        |
| 5.5 Kalibraatiokäyrien mittaust                                | 28        |
| <b>6 TULOKSET JA ARVIOINTI</b>                                 | <b>29</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.1 Kelaatin komponenttien valinta  | 29        |
| 6.2 Haihdutustavan ja lämpötilan valinta  | 32        |
| 6.3 Kuoppalevyn valinta ja mikrosentrifugiputken pinnoituksen vaikutuksen selvittäminen | 33        |
| 6.4 Lantanidin ja ligandien pitoisuuden sekä lisäystavan vaikutus                       | 34        |
| 6.5 Näytepuskurin valinta   | 37        |
| 6.6 Kuolleiden solujen havaitseminen  | 39        |
| 6.7 Liuottimien ja kasvatusmediumin vaikutus menetelmän herkkyyteen                     | 39        |
| 6.8 Puskurin fosfaattipitoisuuden optimointi  | 40        |
| 6.9 Europiumin ja ligandien vuorovaikutus bakteerien kanssa                             | 41        |
| 6.10 Menetelmän herkkyyden määrittäminen  | 43        |
| <b>7 PÄÄTELMÄT</b>  | <b>45</b> |
| <b>8 YHTEENVETO</b>   | <b>47</b> |
| <b>LÄHTEET</b>  | <b>49</b> |

## KUVAT

Kuva 1. Gram-positiivisen (a) ja Gram-negatiivisen (b) bakteerin soluseinän rakenne.14

## KUVIOT

|  |    |
|--|----|
| Kuvio 1. Jablonskin diagrammi  | 9  |
| Kuvio 2. Aikaerotteisen luminesenssin periaate   | 12 |
| Kuvio 3. Coulter Counter menetelmän toimintaperiaate.                                    | 18 |
| Kuvio 4. Lusiferiinin reaktiot valon muodostuksessa.                                     | 20 |
| Kuvio 5. Eri ligandeista muodostettujen $\text{EuCl}_3$ -kelaattien vaikutus signaaliin. | 31 |
| Kuvio 6. Europiumin ja ligandien erillään lisäyksen vaikutus signaaliin.                 | 35 |
| Kuvio 7. Kelaatin komponenttien lisäysjärjestyksen ja inkuboinnin vaikutus signaaliin.   | 36 |
| Kuvio 8. Puskurin pitoisuuksien vaikutus signaaliin pH:ssa 4,5.                          | 38 |
| Kuvio 9. Puskurin pitoisuuden vaikutus signaaliin pH:ssa 7,8.                            | 38 |
| Kuvio 10. Näytteiden ja taustan fluoresenssien ero.                                      | 42 |
| Kuvio 11. Kalibraatiokäyrät bakteereille fosfaatittomassa olosuhteessa.                  | 43 |
| Kuvio 12. Kalibraatiokäyrät bakteereille fosfaattia sisältävissä olosuhteissa.           | 44 |

## TAULUKOT

|  |    |
|--|----|
| Taulukko 1. Tutkittujen kelaattien koostumukset. | 30 |
| Taulukko 2. Käytettyjen kuoppalevyjen tiedot.    | 33 |

## KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)

|       |  |
|-------|--|
| AMP   | adenosiinimonofosfaatti  |
| ATP   | adenosiinitrifosfaatti   |
| AU    | engl. absorbance unit  |
| CDA   | 4-hydroksipyridiini-2,6-dikarboksylihappo (engl. chelidamic acid)dATP deoksiadenosiinitrifosfaatti |
| DMDPO | dimetyylidekyylifosfiinioksidi   |
| DMSO  | dimetyylisulfoksidi  |
| DNA   | deoksiribonukleiinihappo   |
| DPA   | dipikoliinihappo (engl. dipicolinic acid)  |
| EFI   | engl. Europium Fluorescence Intensifier  |
| HEPES | 2-[4-(2-hydroksietyyli)-1-piperatsinyyli]-etaanisulfonihappo                                       |
| MES   | 2-(N-morpholino)etaanisulfonihappo   |
| NTA   | 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftyyli)-1,3-butaanidioni  |
| PBS   | fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. phosphate-buffered saline)                                   |
| PCR   | polymeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction)  |
| Phen  | 1,10-fenantroliini   |
| PMMA  | polymetyylimetakrylaatti   |
| RNA   | ribonukleiinihappo   |
| STD   | keskihajonta (engl. standard deviation)  |
| TBPO  | tributyylifosfiinioksidi   |
| TOPO  | trioktyylifosfiinioksidi   |
| TPPP  | trifenyylifosfiinioksidi   |
| Tris  | 2-amino-2-(hydroksimetyyli)propaani-1,3-dioli  |
| TSB   | engl. Tryptic Soy Broth  |
| TTA   | tenoyylitrifluoroasetoni   |

# 1 JOHDANTO

Bakteerien kvantitointi on nykypäivänä tärkeää monessa yhteydessä. Bakteerimäärien mittaaminen on tärkeää muun muassa lääketuotannossa, tuotettaessa molekyyliä mikrobeilla, kasvavana osana ympäristön saasteiden monitorointia ja puhdistusmenetelmien kehitystä sekä tuotantolaitosten pintojen hygienian kontrolloinnissa. Kaupallisia menetelmiä on saatavilla monia ja niiden ominaisuudet vaihtelevat suurestikin toisistaan. Osa menetelmistä käyttää kallista ja erityistä osaamista vaativaa tekniikkaa, kun taas osat menetelmistä ovat aikaa vieviä ja epätarkkoja.

Opinnäytetyön empiirinen osuus suoritettiin Turun yliopiston lääketieteelliseen tiedekuntaan kuuluvassa Biofysiikan laboratoriossa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää halpa, nopea ja helppo menetelmä bakteerien kvantitoimiseksi. Menetelmä perustuu  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatin epäspesifiseen sitoutumiseen ja aikaerotteeseen fluoresenssiin. Näytteiden bakteerien lukumäärän kasvu havaitaan signaalin muutoksena. Menetelmän kehityksessä standardeina käytettyjen suspensioiden bakteeripitoisuudet määritettiin absorbanssimittauksella tai maljauksella. Menetelmää kehitettäessä optimoitiin useita erilaisia olosuhteita ja havainnoitiin niiden vaikutusta saatavan signaalin tasoon ja stabiilisuuteen sekä menetelmän herkkyyteen.

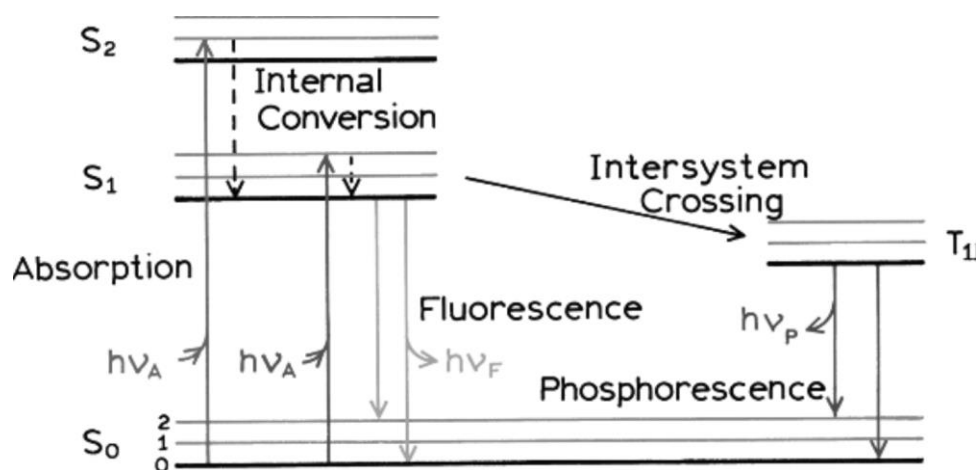
Optimoitaviin olosuhteisiin kuuluivat muun muassa näytepuskurien komponentit ja pitoisuudet, kelaatin rakenne ja pitoisuus, haihdutus ja menetelmän herkkyys kasvatusmediumille. Kelaatin ja bakteerien vuorovaikutusta tutkittiin Gram-negatiivisella ja -positiivisella bakteerilla, jotta soluseinän mahdollinen vaikutus sitoutumiseen saatiin selville.



## 2 LUMINESENSSI

Luminesenssi on ilmiö, jossa virittynyt molekyyli emittoi valoa. Emittoivan molekyylin viritykseen käytetyn energianlähteen mukaan luminesenssi on jaettu useampiin ryhmiin. Näihin ryhmiin kuuluvat esimerkiksi kemiluminesenssi, jolloin energia on peräisin kemiallisesta reaktiosta, ja fotoluminesenssi, jolloin fotonit toimivat energian lähteenä.<sup>1</sup>

Molekyylin absorboidessa valoa sen elektronit siirtyvät alimmalta energiatasolta jollekin sen viritystiloista. Palautuessaan takaisin energiaminimiinsä molekyyli luovuttaa siirtymien aikana absorptiossa saadun energian. Jablonskin diagrammista (kuvio 1) nähdään energian luovutuksen eri reitit.



Kuvio 1. Jablonskin diagrammi<sup>2</sup>

Energian luovutusreitit perusteella luminesenssia nimetään joko fluoresenssiksi, fosforesenssiksi tai viivästyneeksi fluoresenssiksi. Kaikissa kolmessa tapauksessa emittoituneen valon energia on energiahäviöiden vuoksi pienempi kuin absorboituneen valon energia. Tämän vuoksi emissioaallonpituus on absorptioaallonpituutta korkeampi. Ilmiö tunnetaan nimellä Stokesin siirtymä.<sup>3</sup>

## 2.1 Fluoresenssi

Molekyylin perustilassa, jota kutsutaan  $S_0$ -tasoksi (singlettitaso 0), molekyylin korkeimmalla energiatasolla kiertää kaksi elektronia, joiden kiertosuunnat ovat toisiinsa nähden vastakkaiset. Absorboidessaan valoa molekyylin korkeimmalta energiatasolta toinen elektroni siirtyy viritystilaan. Jos elektroni säilyttää kiertosuuntansa, se siirtyy jollekin korkeammista singlettitiloista ( $S_n$ ). Virittyneet singlettitilat, niin kuin perustilakin, muodostuvat useammista värähtelytasoisista.<sup>1,4</sup>

Absorption jälkeen molekyyli pyrkii välittömästi palautumaan energiaminiimiinsä eli  $S_0$ -tasolle, jolloin se vapauttaa energiaa eri tavoin. Elektronin siirtymisestä saavutetusta viritystilasta  $S_n$  alimmalle virittyneelle singlettitilalle  $S_1$  käytetään nimitystä sisäinen siirtymä tai värähtelyrelaksaatio.<sup>1</sup> Tämän siirtymän aikana osa energiasta siirtyy lämpönä molekyylin ympäristöön. Elektronin siirtyessä edelleen alimmalta virittyneeltä tilalta  $S_1$  perustasolle  $S_0$ , molekyyli luovuttaa energian fluoresoimalla eli emittoimalla valoa tietyllä aallonpituudella. Perinteisessä fluoresenssissa singlettitilan purkautuminen kestää yleensä noin 10 ns.<sup>2</sup>

## 2.2 Fosforesenssi

Fosforesenssin tapauksessa elektroni siirtyy valon absorption vaikutuksesta jollekin virittyneistä singlettitasoista säilyttäen kiertosuuntansa. Elektroni luovuttaa osan energiasta siirtymällä korkeimmalta saavutetulta viritystilalta  $S_n$  matalimpaan viritystilaan  $S_1$  kuten fluoresenssissa.

Matalimmalta virittyneeltä singlettitilalta elektroni ei siirry perustasolle, vaan siirtyy systeemin väliseksi siirtymäksi kutsutun tapahtuman kautta triplettitilaan  $T_1$ . Systeemin sisäisen siirtymän aikana elektronin kiertosuunta muuttuu päinvastaiseksi, jolloin perustasolla olevan elektronin ja virittyneessä tilassa olevan elektronin kiertosuunnat ovat samat. Ennen kuin elektroni pystyy palaamaan  $S_0$ -tasolle, tulee sen vaihtaa kiertosuuntansa takaisin vastaamaan lähtötilannetta. Siirtymää kutsutaan myös nimellä kielletty siirtymä<sup>1</sup> ja sen aikana molekyyli luo-

vuttaa energiaa säteilyinä, jota kutsutaan fosforesenssiksi. Kiertosuunnan vaihtumisen vuoksi elektronin siirtyminen triplettiltasolta perustasolle kestää kauemmin singlettitasolta siirtymiseen verrattuna. Fosforesenssissa singlettitalan purkautuminen vie jopa millisekunneista sekuntiin.<sup>2</sup>

### 2.3 Viivästynyt fluoresenssi

Viivästyneessä fluoresenssissa elektroni siirtyy ensin jollekin viritetylle singlettitasolle ja alimmalta viritetyltä singlettitasolta  $S_1$  se siirtyy systeemin välisen siirtymän kautta triplettiltasolle  $T_1$ . Triplettiltasolla elektroni voi edelleen aktivoitua kahden eri mekanismin kautta, mikä saa aikaan elektronin siirtymisen takaisin  $S_1$ -tasolle. E-tyypin viivästyneessä fluoresenssissa aktivaatio tapahtuu lämpöenergian avulla. P-tyypissä aktivaatioenergia siirtyy yhdeltä triplettiltilassa olevalta molekyyliltä toiselle molekyylille, jonka elektroni siirtyy viritetylle singlettitalalle. Molekyyli emittoi siis singlettitalan purkautuessa kuten fluoresoivat molekyylit, mutta emission kesto vastaa fosforesenssia.<sup>1</sup>

### 2.4 Fluorokromit

Fluorokromit tai fluoroforit ovat fluoresoivia molekyylejä, joita käytetään tutkimuksen kohteena olevien organismien tai molekyyliden värjäykseen ja leimaukseen. Fluorokromien ominaisuudet vaihtelevat hyvinkin paljon molekyylistä riippuen. Tärkeimpiä näistä ovat muun muassa fluorokromin virittymisen taso tietyllä aallonpituudella, absorptio- ja emissiopiikkien kapeus ja korkeus, emission elinikä sekä kvanttisaanto. Kvanttisaannolla tarkoitetaan emittoituneen valon suhdetta absorboituneen valon määrään. Näiden lisäksi pitkä Stokesin siirtymä on suotavaa, minkä ansiosta emissiospektri on helposti erotettavissa absorptiospektristä.

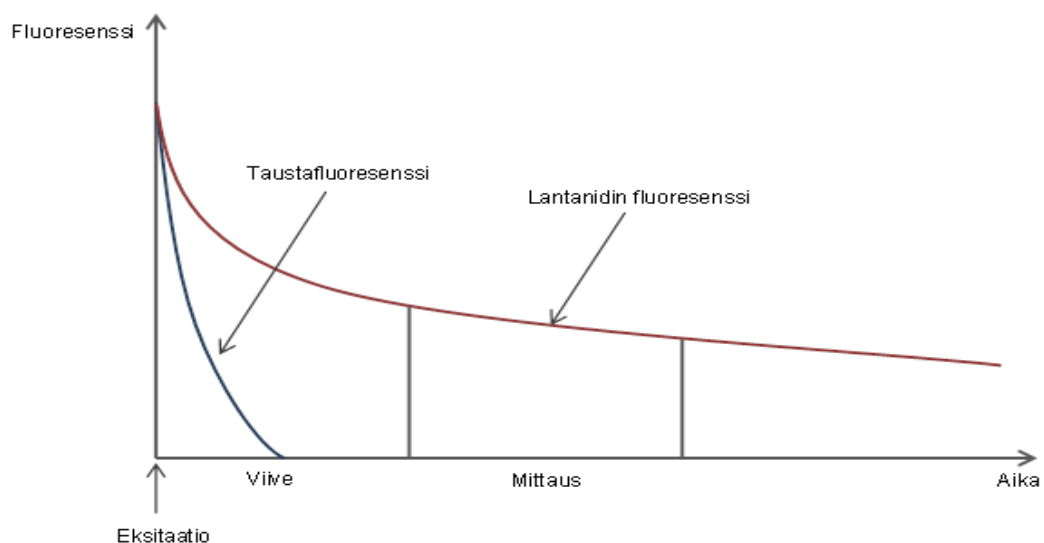
Fluorokromien ominaisuudet voivat vaihdella ympäristönsä vaikutuksesta. Muun muassa fluoresenssi voi riippua hydrofiilisestä tai hydrofobisesta ympäristöstä,

pH:sta, fluorokromin konsentraatiosta tai ympäröivän liuoksen ionikonsentraatiosta.<sup>1,5</sup>

## 2.5 Aikaerotteinen fluorometria

Spektroskopiaan luettava fluorometria on fluoresenssista aiheutuvien emissiospektrien mittaamiseen käytettävä menetelmä. Perinteisessä fluoresenssimittauksessa luonnollisesti fluoresoivat molekyylit voivat häiritä kohdesignaalia aiheuttamalla korkean taustafluoresenssin. Tällöin mitattava signaali erottuu huonosti taustasignaalista vaikuttaen menetelmän herkkyyteen. Perinteisessä mittauksessa viritykseen käytetään mittauksen ajan jatkuvaa valonsädettä ja emissiospektri on detektoitavissa välittömästi eksitaation aloittamisen jälkeen.<sup>2</sup>

Aikaerotteisessa fluorometriassa mittauksen parametrit poikkeavat merkittävästi perinteisen fluoresenssin mittauksen parametreista. Menetelmän tavoitteena on minimoida mitattavaa signaalia häiritsevä taustasignaali. Mittauksessa fluoresoivat molekyylit viritetään eksitaatiopulssilla, jonka jälkeen emission detektointi tapahtuu vasta lyhyen viiveen jälkeen tietyn mittausajan. Detektiota edeltävän viiveen aikana taustasignaali laskee kuvion 2 mukaisesti, eikä häiritse mittauksen kohteena olevan emission detektointia.

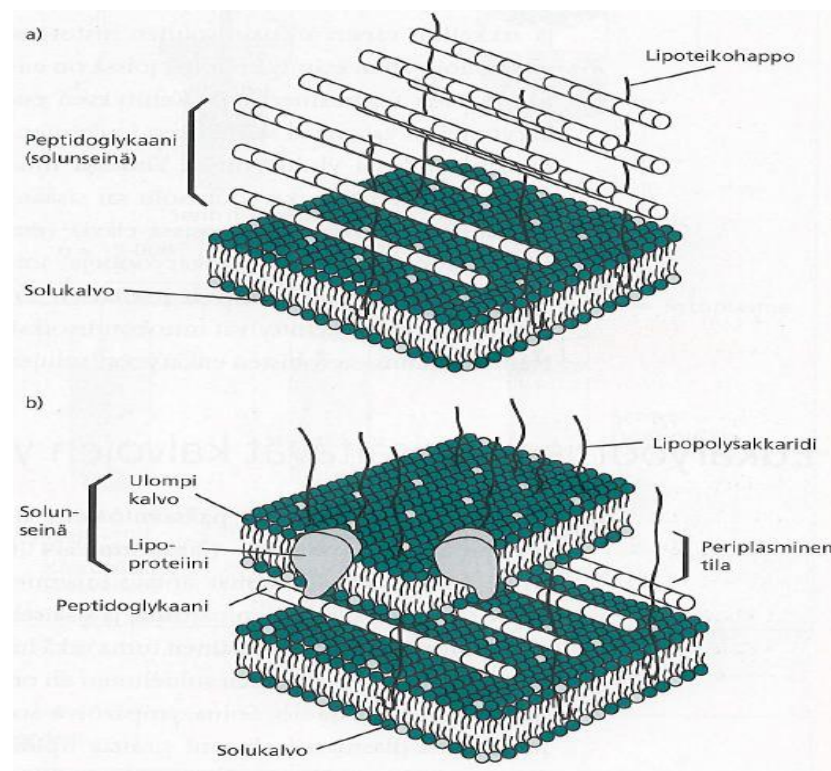


Kuvio 2. Aikaerotteisen luminesenssin periaate

Mittausviiveen vuoksi mittauksissa tulee käyttää molekyylejä, jotka fluoresoivat perinteisissä mittauksissa käytettäviä fluorokromeja pidempään. Tällaisia fluorokromeja ovat muun muassa lantanideihin kuuluvat europium- ja terbiumkelaa-  
tit, joiden emission eliniät ovat pisimmillään millisekunteja.<sup>1</sup>

### 3 BAKTEERIEN JAOTTELU SOLUSEINÄN RAKENTEEN PERUSTEELLA

Gram-värijäyksen perusteella bakteerit voidaan luokitella kahteen pääryhmään, joiden erot perustuvat niiden soluseinien rakenteisiin kuvan 1 mukaisesti. Värijäyksen aiheuttaman reaktion perusteella nämä kaksi ryhmää ovat Gram-positiiviset ja Gram-negatiiviset bakteerit.<sup>6</sup>



Kuva 1. Gram-positiivisen (a) ja Gram-negatiivisen (b) bakteerin soluseinän rakenne.<sup>7</sup>

Gram-negatiivisia bakteerisoluja ympäröiviin suojarakenteisiin kuuluvat sytoplasmaa ympäröivä solukalvo ja lipopolysakkarideja sisältävä ulkokalvo. Näiden kahden kalvorakenteen väliin jäävää tilaa kutsutaan periplasmiseksi tilaksi, jossa sijaitsee ohut soluseinä. Gram-positiivisilta bakteereilta ulompi kalvo puuttuu, mutta niiden solukalvoa ympäröivä soluseinä on paksumpi kuin Gram-

negatiivisilla bakteereilla. Molemmissa tapauksissa soluseinä koostuu peptidoglykaanista eli mureiinista. Peptidoglykaani on disakkaridi-polymeeri, jonka rakennetta lujittaa polymeerien väliset, peptidiketjuista muodostuneet, ristisilloitukset.<sup>8</sup> Soluseinä antaa bakteereille niiden tyypillisen muodon sekä toimii vahvana suojakerroksena, minkä ansiosta bakteerisolut sietävät mekaanista rasitusta eläinsoluja enemmän.

Gram-värjäyksessä erot näiden kahden ryhmän välillä perustuvat soluseinämän ulkokalvoon. Värjäyksessä kristallinvioletti-väriaine ja jodi muodostavat bakteerien sisällä kompleksin. Värjäystä seuraava alkoholikäsittely pienentää Gram-positiivisten bakteerien soluseinää, minkä vuoksi väriaine pysyy Gram-positiivisten bakteerien sisällä. Gram-negatiivisista bakteereista väri huuhtoutuu pois, sillä alkoholi liuottaa niiden ulomman kalvon lipidejä. Käsittelyn jälkeen vastavärjäyksessä safraniinilla Gram-negatiiviset bakteerit värjäytyvät punaisiksi.

## 4 KVANTITOINTIMENETELMIÄ

Solujen lukumäärän selvittäminen mikrobiologiassa on monesti erittäin tärkeää. Menetelmiä on lukuisia, maljauksesta kaupallisiin monimutkaisia laitteita käyttäviin menetelmiin saakka. Usein ongelmaksi syntyvät esimerkiksi menetelmien epätarkkuus, mittaukseen kuluva aika tai herkkyys. Joillakin menetelmillä ei myöskään pystytä erottamaan, ovatko solut eläviä vai kuolleita. Määritykset voivat perustua esimerkiksi kemiallisia, elektronisia tai visuaalisia mittauksia hyödyntäviin menetelmiin. Esimerkiksi solun metaboliaan liittyen on aiemmin kehitetty kvantitointimenetelmiä, joiden herkkyys on ollut parhaimmillaan 100 solua/näyte. Nykyään kuitenkin lisääntyneen tiedon vuoksi menetelmät kyseenalaistetaan, sillä solujen metabolia ei ole ajan suhteen vakio.

### 4.1 Maljaus ja mikroskopia

Maljaus soveltuu ainoastaan eläville jakaantumiskykyisille soluille, jotka kasvaessaan voivat muodostaa pesäkkeitä. Bakteereita maljattaessa näytteestä valmistetaan yleensä useita eri laimennoksia, joista sitten maljataan haluttua laimennosta muutama sata mikrolitraa kiinteälle agarmaljalle. Tämän jälkeen näytteitä inkuboidaan maljoilla sopivissa olosuhteissa pesäkkeiden muodostumiseksi. Inkuboinnin jälkeen pesäkkeiden lukumäärä maljoilta lasketaan ja laimennuskertoimen avulla saadaan tästä tiedosta alkuperäisen laimentamattoman näytteen lukumäärä. Koska aina ei voida olla varmoja, onko pesäke peräisin vain yhdestä bakteerisolusta, tulokset ilmoitetaan yleensä yksikössä pmy/ml eli pesäkkeen muodostava yksikkö millilitraa kohden. Menetelmä ei anna nopeasti tietoa lukumäärästä, sillä inkubointi vie ainakin vuorokauden, eikä sillä myöskään havaita näytteessä mahdollisesti olevia kuolleita soluja.<sup>9</sup>

Maljausta nopeampi menetelmä on käyttää solulaskukammioita, joilla voidaan laskea nestemäisen näytteen bakteeripitoisuus laimentamattomana tai laimennettuna. Kammioon on merkitty alueita, joilla on tietty pinta-ala. Kun solujen



keskimääräinen lukumäärä lasketaan näiltä rajatuilta alueilta, valmistajan tietojen mukaan voidaan laskea näytteen kokonaisbakteeripitoisuus (bakteerien lukumäärä/ml). Bakteerien erottaminen mikroskoopilla voi olla hankalaa ja useiden näytteiden bakteeripitoisuuksia määritettäessä menetelmä on hidas. Tämän lisäksi tulokset ovat subjektiivisia.<sup>9</sup>

#### 4.2 Sameusmittaus

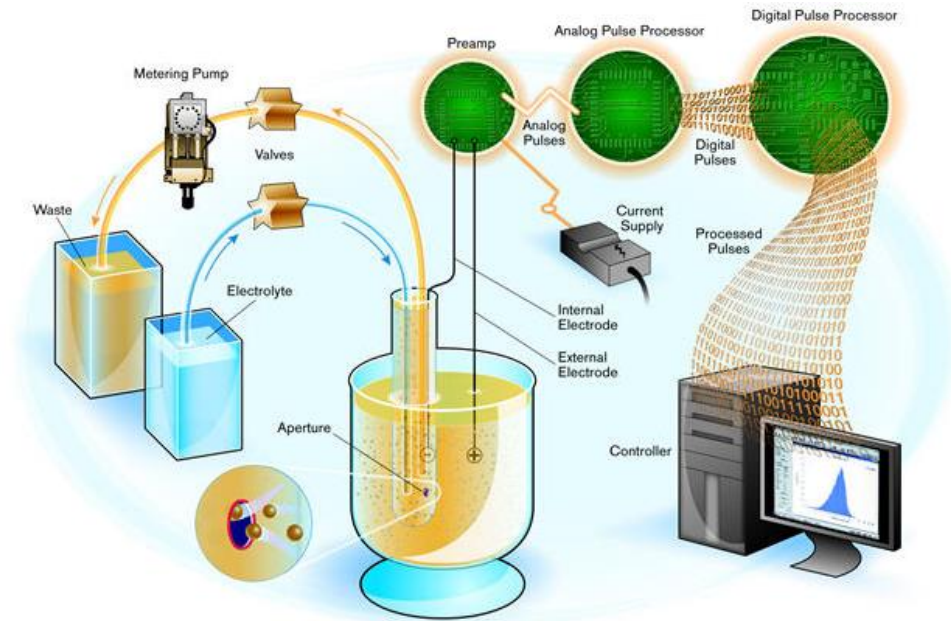
Bakteerisoluja sisältävän mediumin sameuden mittaus on nopea tapa arvioida näytteen solutiheyttä. Erityisesti suurten näytemäärien kanssa absorbanssin mittaaminen on nopeampaa ja helpompaa kuin esimerkiksi maljaus. Mittaus voidaan suorittaa kolorimetrillä tai spektrofotometrillä. Ennen mittauksia tulee määrittää eri bakteerilajeille kertoimet standardisuorasta, jossa on määritetty eri laimennoksien absorbanssia vastaava pesäkelukumäärä (maljattu mitattua laimennosta tai laskettu solulaskukammiolla). Kertoimia ei tarvitse määrittää uudelleen samalle lajille, vaan tietyn bakteerilajin kertoimia voi käyttää jatkossa suoritettavissa mittauksissa.<sup>9</sup>

Menetelmä perustuu valonkulkuun mitattavassa näytteessä. Esimerkiksi spektrofotometrillä mitattaessa absorbanssia, näytekyvetin läpi kulkevan valonsäteen intensiteettiä mitataan. Mitä enemmän näytteessä on bakteereita, sitä enemmän valoa siroaa bakteerien pinnasta ja absorboituu näytteeseen, sitä heikompi detektorille tulleen valon intensiteetti on.

#### 4.3 Coulterin laskija

Coulterin laskija on vuonna 1953 partikkelien määrien ja koon määrittystä varten kehitetty menetelmä, jota voidaan hyödyntää myös solujen laskemiseen. Laitteen kehittäjän tarkoituksena on ollut kehittää nopea, herkkä ja helppokäyttöinen menetelmä, jota voi kokematonkin käyttää.<sup>10</sup>

Menetelmässä käytetään hyödyksi virtapiiriä ja mitattavana suureena on impedanssi. Kuvio 2 esittää menetelmän toimintaperiaatteen.



Kuvio 3. Coulter Counter menetelmän toimintaperiaate.<sup>11</sup>

Periaatteena on, että solususpensio johdetaan vakuumin avulla läpi putken pienen suuaukon, josta solut mahtuvat juuri ja juuri yksi kerrallaan. Tämän solujenmentävän aukon molemmin puolin on asetettu elektrodit virtapiiriin muodostamiseksi. Kun solut läpäisevät aukon, ne aiheuttavat muutoksia mitattavaan impedanssiin. Näistä solujen aiheuttamista pulsseista impedanssissa lasketaan solujen lukumäärä analysoitua tilavuutta kohden. Menetelmä siis vaatii melko monimutkaisen laitteiston, joka on suuri investointi.

Laitteella pystytään analysoimaan pienimmillään 50  $\mu\text{l}$  näytetilavuuksia ja näytteessä soluja, joiden halkaisija on 0,4  $\mu\text{m}$  ja 1 mm välillä, tulisi olla vähintään muutamia tuhansia.<sup>12</sup> Solumäärän kasvaessa solut voivat tunkeutua aukon läpi yhtäaikaaisesti, jolloin tehokkaan sekoituksen merkitys korostuu. Menetelmän heikkoutena on se, että partikkelit tai solut pitää suspensoida elektrolyyttiliuokseen, jotta erot sähkönjohtavuudessa ovat havaittavissa.<sup>13</sup>

#### 4.4 DNA-määritykset

Solu- ja molekyylibiologiassa tarvitaan usein menetelmiä DNA-pitoisuuden määrittämiseen. Myös lääkkeiden kehitykseen tähtäävissä tutkimuksissa käytetään

yhä enemmän kyseisiä menetelmiä. Bakteerisolut sisältävät arviolta muutamia kymmeniä femtogrammoja DNA:ta.<sup>14</sup> Vaikka yksittäisessä solussa (bakteeri- tai eläinsolu) DNA:n määrä vaihtelee ajan myötä, viljelmissä DNA-pitoisuus pysyy kokonaisuudessaan melko vakiona.<sup>15</sup> Kuitenkin eri bakteerilajien välillä DNA:n määrä vaihtelee, joten tulokset eivät ole suoraan verrannollisia bakteerien lukumäärään tuntemattomassa näytteessä.

Yksinkertaisin DNA-pitoisuuden määrittäminen perustuu DNA:n nukleotidien absorptioon, jota voidaan mitata 260 nm:ssä. Menetelmän helppoudesta huolimatta, sen heikkoudeksi on osoittautunut herkkyys pienillekin epäpuhtauksille. Esimerkiksi näytteen proteiinit, RNA ja vapaat nukleotidit aiheuttavat virhettä tuloksiin.

Menetelmää häiritsevien tekijöiden vaikutuksen minimoimiseksi on kehitetty lukuisia erilaisia fluoresoivia väriaineita. Nämä yksinään heikosti fluoresoivat reagenssit sitoutuvat selektiivisesti kaksijuosteiseen DNA:han ja vuorovaikutus adeniini-tymiini- sekä guaniini-sytosiini-emäsparien kanssa saa aikaan fluoresenssin kasvun.<sup>16,17,18</sup> Väriaineet voivat olla solun läpäiseviä tai läpäisemättömiä. Solun läpäiseviä väriaineita käytettäessä ei tarvita näytteen esikäsittelyä, kun taas solun läpäisemättömillä väriaineilla näytteen solut tulee ensin hajottaa. Näiden DNA:ta hyödyntävien menetelmien herkkyys vaihtelee 100 solusta 10 000 soluun näytteessä.

#### 4.5 ATP-määrittäminen

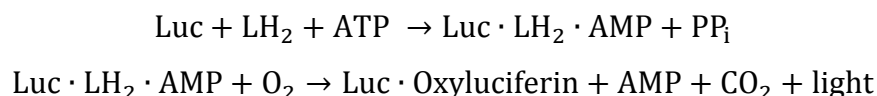
Solut tuottavat ATP:tä eli adenosiinitrifosfaattia niiden soluhengityksen aikana ja käyttävät sitä energian lähteenä erilaisiin elintoimintoihinsa. ATP on yksi solujen elämälle välttämättömistä molekyyleistä ja solun kuoltua se hajoaa nopeasti muutamassa minuutissa, joten menetelmällä voidaan määrittää ainoastaan elävien solujen määrää.

Kaikissa elävissä soluissa ATP:n määrä on vakio ja yksi bakteerisolu sisältää noin 0,01 fmol ATP:tä. Menetelmällä voidaan havaita yksittäinen bakteeri, sillä pienin havaittava ATP määrä on 0,01-0,1 fmol.<sup>19</sup> Tarkkuutta lisää lusiferaasin

spesifisyys ATP:lle, sillä DNA:n rakennusaineena solujen käyttämä dATP:n (deoksiadenosiinitrifosfaatti, yksi DNA:n neljästä nukleotidista) aktiivisuus reaktiossa on vain 5 % ATP:n aktiivisuudesta.<sup>20</sup>

Useat valmistajat tarjoavat kaupallisia ATP:n määrittämis-kittejä, joissa näytteen seen lisätään yleensä kahta reagenssia, toinen sisältää detergenttiä, joka vapauttaa ATP:n solun sisältä ja toinen on lusiferaasi/lusiferiini-reagenssi.

Reagenssien lisäyksen jälkeen näytteen ATP muuttuu entsyymien katalysoimana lusiferiinin muotoon, josta se pystyy hapettumaan ja samalla syntyy valoa. Lusiferiinin reaktio tapahtuu kahdessa vaiheessa. Ensin ATP:n luovuttaessa fosfaattimolekyylin muodostuu adenosinimonofosfaatista ja lusiferiinistä AMP-lusiferiini-kompleksi, minkä jälkeen se hapettuu ilman hapen vaikutuksesta oksilusiferiiniksi kuviossa 4 esitetyn reaktioyhtälön mukaisesti.



Kuvio 4. Lusiferiinin reaktiot valon muodostuksessa. Kuviossa Luc = lusiferaasi, LH<sub>2</sub> = lusiferiini, PP<sub>i</sub> = ATP:stä vapautuneet fosforit.<sup>21</sup>

Reagenssien lisäysten jälkeen näyte on heti mitattavissa luminometrillä. Detektoitava valo on neutraaleissa ja emäksisissä olosuhteissa vihreää, kun taas happamassa ja raskasmetallien läsnäollessa valo on punaista. Syntyneen valon intensiteetti on optimaalisissa olosuhteissa ja pienessä ATP-pitoisuudessa suoraan verrannollinen näytteen ATP:n ja solujen määrään.<sup>19</sup>

## 5 MENETELMÄT JA MATERIAALIT

Tutkimuksessa kvantitoitavina bakteereina käytettiin sekä gram-positiivisia että gram-negatiivisia bakteereita, jotta nähtäisiin soluseinämän vaikutus menetelmän käytettävyyteen. Gram-positiivisena bakteerina käytettiin *Bacillus subtilista* ja gram-negatiivisena *Escherichia colia*. Bakteerit kasvatettiin mediumissa, josta ne pestiin ja lisättiin laimennoksina näytepuskureihin.

Näytteiden fluoresenssisignaalit mitattiin Victor<sup>2</sup>-laitteella (PerkinElmer Finland Oy, Turku) käyttäen aikaerotteista fluorometriaa. Viritys tapahtui aallonpituudella 340 nm. 400 µs viiveen jälkeen emission mittausta suoritettiin 615 nm:ssä 400 µs ajan. Virityksessä lantanidiin sitoutunut ligandi virittyy ja siirtää aktivaatioenergiaa lantanidille, mikä johtaa lantanidin fluoresoimiseen. Kyseinen ilmiö tunnetaan P-typin viivästyneenä fluoresenssina. Mittauksia suoritettiin 30 minuutin välein noin kahden tunnin ajan, jotta nähtäisiin signaalin muutos ajan suhteen.

Kehitettävällä kvantitointimenetelmällä havainnoitiin eri olosuhteiden vaikutusta signaaliin ja menetelmän herkkyyteen.

### 5.1 Bakteerien esikäsittely

Bakteerit siirrostettiin aina edellisenä päivänä maljalta TSB-mediumiin ja inkuboitiin yön yli (250 rpm, 37 °C).

Ennen laimennosten valmistamista bakteerit pestiin mediumista sentrifugoimalla 2 ml:n mikrosentrifugiputkissa (4000 rpm, 3 min) neljästi ja bakteerit suspensioitiin 1x PBS-liuokseen (fosfaattipuskuroitu saliniliuos). Fosfaattipuskuroitua saliniliuosta käytettiin isotonisen osmoottisen paineen (sama osmoottinen paine bakteerin sisä- ja ulkopuolella) aikaansaamiseksi. Jos osmoottinen paine olisi suurempi bakteerin sisällä kuin ulkopuolella (kuten esimerkiksi vettä käytettäessä, jolloin vesi on hypotoninen), ottaisi solu sisäänsä ulkopuolista liuosta os-

moottisen paineen tasaamiseksi. Tästä syystä solu turpoaisi ja lopulta hajoaisi soluseinän antaessa periksi.

Pesun jälkeen bakteerisuspensiosta valmistettiin 1x PBS-liuokseen 1:100-laimennos, josta mitattiin absorbanssi aallonpituudella 600 nm (Ultrospec 2100 pro, GE Healthcare) käyttäen polymetyylimetakrylaatti-kyvettiä (PMMA-kyveti). Absorbanssista laskettiin laimentamattoman suspension bakteeripitoisuus käyttämällä kerrointa  $1 \text{ AU} = 3 \cdot 10^8$  bakteeria/ml. Kerroin oli määritetty aiemmin laboratoriossa aiemmin tehdyn mittauksen yhteydessä. Pestystä suspensiosta valmistettiin laimennokset eri olosuhteisiin.

## 5.2 Kuolleiden bakteerien vaikutus signaaliin

Yhtä testikertaa varten bakteerisuspensiota pipetoitiin petrimaljalalle ohueksi nestekerrokseksi ja tämä siirrettiin UV-lampun (teho 30 W) alle noin 5 senttimetrin etäisyydelle lampusta 5 minuutiksi. Käsittelyn tarkoituksena oli tappaa bakteerit ja tutkia menetelmän toimivuutta myös kuolleilla bakteereilla. Bakteerien viabiliteetti todennettiin maljaamalla suspensiota TSB-agarille.

## 5.3 Näytteiden valmistus

Näytteet valmistettiin 1,5 ml mikrosentrifugiputkiin lisäämällä 600 µl:aan puskuria eri määriä bakteereita. Nollanäytteeseen ei lisätty lainkaan bakteereja. Eri bakteerimäärät laskettiin pesun jälkeen mitatusta absorbanssista suspension bakteeripitoisuus. Mikrosentrifugiputkiin valmistettuihin näytteisiin saatiin laskennallisiksi bakteerimääräksi 0,  $2 \cdot 10^5$ ,  $2 \cdot 10^6$  ja  $2 \cdot 10^7$ . Bakteerien lisäyksen jälkeen näytteseokseen lisättiin vielä 10 µl:ssa  $\text{EuCl}_3$  tai  $\text{TbCl}_3$  ja ligandit yhtenä liuoksena tai kumpaakin, lantanidia ja ligandeja, erikseen 10 µl. Valmistetuista näytteistä pipetoitiin neljät rinnakkaiset 10 µl:n, 20 µl:n tai 70 µl:n näytteet kuoppalevylle kuopan koosta riippuen.

Menetelmää kehitettäessä testattiin monia eri olosuhteita, jotta löydettäisiin parhaiten toimivat tekijät, joilla pystyttäisiin havaitsemaan näytteestä mahdollisim-

man pieni bakteeripitoisuus. Näihin olosuhteisiin kuuluivat esimerkiksi kaksi eri lantanidia ja niille sopivat ligandit, haihdutus, puskurit ja suolan lisäys ja kuoppalevyt.

### 5.3.1 Kelaattien valmistus

Kelaatin valmistamisessa testattiin kahta eri fluoresoivaa lantanidia,  $\text{Eu}^{3+}$  ja  $\text{Tb}^{3+}$ , sekä niille sopivia ligandeja.  $\text{EuCl}_3$ - ja  $\text{TbCl}_3$ -kelaatit valmistettiin joko lisäämällä lantanit ligandien kanssa samaan seokseen, tai  $\text{EuCl}_3$ - ja  $\text{TbCl}_3$  pidettiin omana liuoksena ja ligandit yhdistettiin yhdeksi liuokseksi.

#### **$\text{EuCl}_3$ -kelaatti**

$\text{EuCl}_3$ - ja ligandiliuokset valmistettiin liuottamalla reagenssit joko DMSO:hon (dimetyylisulfoksidi, puhtaus yli 99,9 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) tai asetoniin (puhtaus yli 99,9 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) niiden heikon vesiliukoisuuden vuoksi.

$\text{EuCl}_3$ :lle (puhtaus yli 99,9 %, Alfa Aesar, Iso-Britannia) käytettiin seuraavia orgaanisia molekyyliä ligandeina:

- NTA (4,4,4-trifluoro-1-(2-naftyyli)-1,3-butaanidioni, puhtaus yli 99 %, Acros Organics, New Jersey)
- Phen (1,10-fenantroliini, puhtaus yli 99 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- TTA (tenoyylitrifluoroasetoni, puhtaus yli 99 %, Sigma Aldrich, Iso-Britannia)
- TOPO (trioktyylifosfiinioksidi, puhtaus yli 99 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- TPPP (trifenyylifosfiinioksidi, puhtaus yli 98 %, Fluka Biochemika, Sveitsi)
- DMDPO (dimetyylidekyylifosfiinioksidi, puhtaus yli 98 %, Fluka Biochemika, Sveitsi)

- TBPO (tributyylifosfiinioksidi, puhtaus yli 95 %, Sigma Aldrich, Steinheim, Saksa)

Kolme ensimmäistä ligandia toimivat kelaatin virittävänä molekyylinä ja neljä viimeistä suojaavat kelaatin rakennetta ja sidoksia hydratoitumiselta. Seoksissa europiumin ja ligandien suhde on 1:9:9 tai käytettäessä yhtä ligandia 1:9. Seokset valmistettiin 20 mM:ksi europiumin suhteen lisäämällä ensin  $\text{EuCl}_3$  DMSO:hon ja seuraavaksi virittävä ja suojaava yhdiste, jolloin ligandien pitoisuus oli 180 mM. Pidettäessä Eu- ja ligandiseokset erillisinä alkupitoisuudet olivat samat ja näistä laimentamalla valmistettiin halutun pitoiset  $\text{EuCl}_3$ /ligandiseokset.  $\text{EuCl}_3$  pitoisuuksina testattiin 0,4; 1,2; 4 ja 12  $\mu\text{M}$ . Ligandien pitoisuuksina testattiin 3,6; 11; 12; 36; 110 ja 120  $\mu\text{M}$ .

$\text{EuCl}_3$ - ja NTA/TOPO-liuoksilla tutkittiin myös  $\text{EuCl}_3$  ja ligandien erillään lisäämisen, lisäysjärjestyksen sekä liuosten lisäyksen välissä tehtävän inkubaation vaikutusta signaaliin.

### **$\text{TbCl}_3$ -kelaatti**

$\text{TbCl}_3$  ja ligandit liuotettiin hyvän vesiliukoisuuden vuoksi MQ-veteen.

Terbiumille käytettiin seuraavia orgaanisia yhdisteitä ligandeina (reagenssit olivat valmiina liuoksina):

- CDA (chelidamic acid, 4-hydroksipyridiini-2,6-dikarboksyylihappo, puhtaus yli 97 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- DPA (dipikoliinihappo, puhtaus 99 %, Acros Organics, New Jersey)
- Tiron (4,5-dihydroksi-1,3-bentseenidisulfonihapon dinatriumsuola, Acros Organics, New Jersey)

Ligandit liuotettiin veteen tai natriumhydroksidin vesiliuokseen. Dipikoliinihappoliuoksen natriumhydroksidipitoisuus oli 0,85 M ja CDA-liuoksen 0,74 M.

$\text{TbCl}_3$  ja ligandeista valmistettiin yksi seos tai erilliset liuokset, joissa  $\text{TbCl}_3$  pitoisuus oli 10  $\mu\text{M}$  ja ligandin 50  $\mu\text{M}$ , jolloin  $\text{TbCl}_3$  ja ligandin suhde oli 1:5.



### 5.3.2 Haihdutus

Menetelmän toimivuutta oli testattu alustavasti jo aiemmin, jolloin oli todettu menetelmän toimivan, jos neste haihdutetaan ensin näytteestä pois. Haihdutusta optimoitiin testaamalla kolmea eri haihdutuslämpötilaa: 37, 76 ja 110 °C. Lisäksi testattiin kuoppalevyllä näytteiden sijoittelun vaikutusta, jättämällä tyhjiä kaivoja näytteiden väliin ja lisäämällä näytteitä ympäröiviin kaivoihin vettä, jolloin reunimmaisets näytteet eivät haihtuisi merkittävästi ennen muita.

Haihdutuksen yhteydessä testattiin, mitä näytteen signaalille tapahtuu ajan myötä. Koska menetelmä näytti toimivan myös haihduttamattomana, päätettiin tästä työvaiheesta luopua.

### 5.3.3 Kuoppalevyt ja mikrosentrifugiputket

Kuoppalevyjä on olemassa monia erilaisia. Niiden valmistusmateriaalit ja niiden myötä värit, kuoppien koot ja sitä myöden kuoppien lukumäärät vaihtelevat. Näiden lisäksi levyt voivat olla eri tavoin pintakäsiteltyjä. Esimerkiksi negatiivisesti varautunut pinnoite edistää solujen hydrofobista sitoutumista kun taas hydrogeelipinnoite ehkäisee juuri hydrofobisuuteen ja ioniseen vuorovaikutukseen perustuvaa sitoutumista kuopan pintaan.<sup>22</sup>

Testatut kuoppalevyt oli tilattu eri valmistajilta. Valmistusmateriaalina oli polystyreeni, mutta nostettaessa haihdutuslämpötilaa jouduttiin testaamaan polypropyleenilevyä sen korkeamman sulamislämpötilan vuoksi. Testeissä käytettiin levyjä, joiden väri ja kuoppien koot vaihtelivat. Tutkitut levyt olivat 96- ja 384-mikroitiitterilevyjä ja värit olivat keltainen, valkoinen ja musta. Myös pintakäsittelyjen vaikutusta tutkittiin.

Kuoppalevyjen lisäksi näytteiden valmistukseen käytettyjen mikrosentrifugiputkien vaikutusta fluoresenssiin tutkittiin. Testeissä verrattiin pinnoittamattomien ja kahden eri valmistajan tarraamattomaksi pinnoitettujen putkien tuloksia.

### 5.3.4 Näytepuskurit ja suolanlisäys

Puskureita valmistettaessa voidaan käyttää yhtä tai useampaa komponenttia puskuroivan vaikutuksen aikaan saamiseksi. Testeissä tutkittiin erilaisia puskureita, joiden valmistuskomponentit, pitoisuus ja pH-arvot vaihtelivat ja niiden vaikutus signaaliin analysoitiin. Käytettyjä liuoksia olivat:

- Tris (pH 4,6; 6,0 ja 7,8)
- Universaalipuskuri (pH 2,5; 4,5; 7,0; 9,0 ja 11,0)
- Glysiinipuskuri (pH 4,3 ja 10,9)
- MES eli 2-(*N*-morfoliini)-etaanisulfonihappo (pH 4,5 ja 7,9)
- HEPES eli 2-[4-(2-hydroksietyyli)-1-piperatsinyyli]-etaanisulfonihappo (pH 4,6 ja 7,8)
- 1x PBS
- TSB-medium
- MQ-vesi

Universaalipuskurin komponentit ovat sitruunahappo, kaliumdivetyfosfaatti, tris(hydroksimetyyli)aminometaani, natriumtetraboraatti ja kaliumkloridi.

Sopivan puskurin löydyttyä optimoitiin pitoisuus ja pH sekä testattiin suolan vaikutus signaaliin. Tällöin näytepuskuria valmistettaessa puskurin lisättiin 5 M NaCl-liuosta eri määriä tietyn pitoisuuden aikaansaamiseksi. Tutkitut suolapitoisuudet olivat 0, 3, 30 ja 300 mM.

### 5.3.5 Fosfaatin lisäyksen optimointi

Näytepuskureista kolmen olosuhteen havaittiin olevan potentiaalisia. Yksi näistä olosuhteista oli fosfaatti, joten fosfaatin lisäystä optimoitiin menetelmän herkkyyden parantamiseksi. Optimoinnin jälkeen kalibraatiokäyrät mitattiin fosfaatitomalla olosuhteella ja olosuhteella, johon oli lisätty fosfaattia.

Tutkimuksessa tarkasteltiin PBS-liuoksen lisäyksen vaikutusta signaaliin lisäämällä näytepuskurin 0; 0,06; 0,2; 0,5; 0,6; 1,6; 6; 16 tai 48 % näyteseoksen tila-

vuudesta. Samassa yhteydessä tarkasteltiin kuopan koon (384- tai 96-mikroitiitterilevyn) vaikutusta.

#### 5.3.6 Liuotinten lisäys sekä Eu/NTA/TOPO:n lisäys liuottimissa

Liuottimien lisäyksen vaikutusta menetelmän määritysherkkyyteen tutkittiin lisäämällä puskurin, bakteerien ja kelaatin sekaan eri liuottimia (dimetyylisulfoksidi eli DMSO, etyleeniglykoli, polyetyleeniglykoli PEG400 ja glyseroli) 8 % seoksen tilavuudesta.

Tämän lisäksi tutkittiin, miten kelaatin lisäys liuottimissa (DMSO, PEG400 ja MQ-vesi) vaikuttaa signaaliin ja menetelmän herkkyyteen. Testissä kelaatit valmistettiin samoin kuin aiemmin, mutta laimennokset tehtiin DMSO:n lisäksi muihin liuottimiin. Näytteisiin ne lisättiin  $\text{EuCl}_3$  suhteen 4  $\mu\text{M}$  pitoisuutena 10  $\mu\text{l}$ :ssa liuotinta.

#### 5.3.7 Mediumin sieto

Näytteisiin lisättiin mediumia eri määriä, minkä avulla voitiin havainnoida, paljonko menetelmä sietää kasvatusmediumia näytteessä. Testiolosuhteen avulla pyrittiin määrittämään, voisiko analysoitava näyte olla mediumissa tai olisiko näyte mahdollista laimentaa suoraan mediumista määrityspuskuriin.

Testeissä lisättiin valmistettuun näytteeseen tilavuuden suhteen 0,01; 0,1; 1,0; 10 ja 30 % kasvatukseen käytettyä mediumia.

#### 5.4 Kelaatin sitoutumistavan määrittäminen

Testeissä tutkittiin europiumin sitoutumista bakteereihin. Testissä näytteet valmistettiin samoin kuin aikaisemmin. Tämän jälkeen rinnakkaisista näytteistä toinen pestiin neljä kertaa sentrifugoimalla solut mikrosentrifugiputken pohjaan ja suspensoitiin pelletti takaisin puhtaaseen puskuriin. Viimeisen pesun jälkeen

20 µl bakteerisuspensiota laimennettiin 980 µl:aan EFI-liuosta (Europium Fluorescence Intensifier, Kaivogen Oy, Turku) ja mitattiin signaali. EFI-liuos sisältää samoja NTA- ja TOPO-ligandeja kuin kelaatti. Liuos irroittaa bakteereihin ja ligandeihin sitoutuneen europiumin ja suuren ligandimolekyylien ylimäärän avulla virittää europium-ionit liuoksesta stabiiliksi kompleksiksi.<sup>23</sup>

Myös NTA:n ja TOPO:n sitoutumista tutkittiin. Ensimmäiset näytteet valmistettiin lisäämällä puskuriin 0 ja  $1,75 \cdot 10^8$  bakteeria, NTA ja TOPO sekä  $\text{EuCl}_3$ . Toiset näytteet valmistettiin samoin kuin edelliset, mutta ligandien ja  $\text{EuCl}_3$ :n lisäyksen välissä näytteet sentrifugoitiin (4000 rpm, 3 min) ja europium lisättiin vasta uuteen mikrosentrifugiputkeen siirrettyyn supernatanttiin. Lopuksi sentrifugoimattomien näytteiden ja sentrifugoitujen näytteiden supernatanttien signaalit mitattiin.

## 5.5 Kalibraatiokäyrien mittaust

Optimiolosuhteiden löydyttyä mitattiin kalibraatiokäyrät molemmille bakteereille käyttäen näytteinä kymmentä eri bakteeripitoisuutta. Kalibraatiokäyrästä määritettiin molemmille bakteereille, *B. subtilis*elle ja *E. coli*lle, dynaaminen määrittelyalue. Dynaamisella alueella tarkoitetaan mittaustalueen ala- ja yläraja-arvoja eli pienintä bakteerien lukumäärää, joka on menetelmällä havaittavissa ja suurinta lukumäärää, joka on erotettavissa korkean näytepitoisuuden signaalitasosta.

## 6 TULOKSET JA ARVIOINTI

Olosuhteiden vaikutuksen arvioinnissa tutkittiin signaalin suuruutta, eri bakteeripitoisuuksien signaalien välisiä eroja, signaalin stabiilisuutta ja mittausten variaatiokertoimia eli suhteellisia hajontoja. Menetelmää kehitettäessä suoritettiin useita mittauksia, joissa tulosten välillä havaittiin pientä vaihtelua. Tästä huolimatta signaalitasot pysyivät suunnilleen samoina. Testeissä näytteiden variaatiokertoimet vaihtelivat laajimmillaan 2 ja 40 %:n välillä, mutta pysyivät suurimaksi osaksi alle 10 %:n. Näytteiden tulokset on esitetty normalisoituina eli näytteen ja nollanäytteen suhteena. Nollanäytteen suhdeluku on aina 1, jolloin näytteessä ei ole bakteereja. Mitä enemmän näytteen suhdeluku poikkeaa arvosta 1, sitä suurempi näytteen bakteeripitoisuus on. Mitä suurempi signaalin muutos on kahden pisteen välillä, sitä helpompi pienikin muutos bakteeripitoisuudessa on havaita. Tulokset on laskettu neljän rinnakkaisen näytteen keskiarvona.

Menetelmän optimointi aloitettiin olosuhteella, jossa bakteerit pestiin 1x PBS-liuokseen, näytepuskurina käytettiin 20 mM Tris-puskuria ja kelaatti lisättiin näytteeseen yhtenä liuoksena 4  $\mu\text{M}$ :na  $\text{EuCl}_3$ :n suhteen. Työn edetessä, eri olosuhteista saatuja tuloksia verrattiin lähtötilanteen signaaliin tai optimoitujen olosuhteiden tuloksiin.

### 6.1 Kelaatin komponenttien valinta

Kelaatteja tutkittaessa havainnoitiin menetelmän toimivuutta kahdella eri lantanidilla ja näihin liitettävien ligandi-yhdistelmien vaikutusta signaaliin. Fluoresenssi mitattiin haihdutetuista näytteistä.

Menetelmää optimoitaessa tutkittiin erilaisia  $\text{EuCl}_3$ :n ja ligandien yhdistelmiä, jotka ovat lueteltuna kappaleessa 5.2.1 Kelaattien valmistus. Myös  $\text{TbCl}_3$ :n ja sille sopivien kolmen ligandin yhdistelmiä tutkittiin. Käytetyt kelaattien koostumukset ovat esitettyinä taulukossa 1.

Taulukko 1. Tutkittujen kelaattien koostumukset.

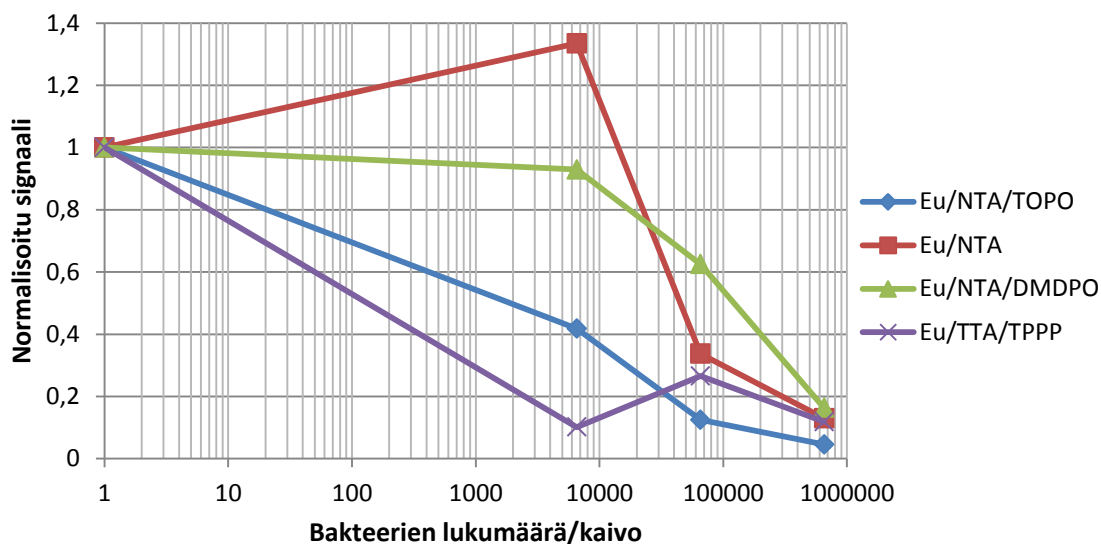
|     | Lantanidi         | Ligandi 1 | Ligandi 2 |
|-----|-------------------|-----------|-----------|
| 1.  | EuCl <sub>3</sub> | NTA       | TOPO      |
| 2.  |                   | NTA       | -         |
| 3.  |                   | Phen      | TOPO      |
| 4.  |                   | NTA       | TPPP      |
| 5.  |                   | NTA       | DMDPO     |
| 6.  |                   | TTA       | -         |
| 7.  |                   | TTA       | TOPO      |
| 8.  |                   | NTA       | TBPO      |
| 9.  |                   | TTA       | TPPP      |
| 10. | TbCl <sub>3</sub> | CDA       | -         |
| 11. |                   | DPA       | -         |
| 12. |                   | Tiron     | -         |

Käytettäessä NTA/TOPO-ligandiyhdistelmää, kelaatti-liuoksen pitoisuus europiumin suhteen oli 4 µM. Yhdisteltäessä muita ligandeja, europiumin pitoisuus oli kymmenkertainen (40 µM), kuitenkin EuCl<sub>3</sub>:n ja ligandien suhdeluvun 1:9:9 tai 1:9 säilyessä. Suurempi pitoisuus johtui ligandien heikommasta viritystehosta. Terbiumia ja ligandeja yhdistettäessä liuoksen pitoisuus TbCl<sub>3</sub>:n suhteen oli 10 µM. TbCl<sub>3</sub>:n ja ligandien suhde näytteessä oli 1:5 tai 1:50.

EuCl<sub>3</sub>-kelaateista yhdistelmien 3, 4, 6, 7 ja 8 signaalit olivat matalat tai bakteeripitoisuuksien välillä signaalit eivät poikenneet toisistaan, joten niillä optimointia ei jatkettu. Näistä saadut signaalit myös laskivat huomattavasti 30 minuutin sisällä, kun taas Eu<sup>3+</sup>/NTA/TOPO:lla signaali pysyi mitattavana jopa kahden tunnin ajan. Stabiili signaali antaa menetelmälle hyödyn, jonka ansiosta näytteitä ei tarvitse analysoida välittömästi valmistuksen jälkeen.

Terbiumkelaatteja tutkittaessa CDA-ligandilla saatu signaali oli suurempi kuin lähtötilanteen europium-kelaatin, mutta signaali ei muuttunut bakteerien määrän kasvaessa. Kahden muun terbium-kelaatin tapauksessa signaalitasot jäivät europiumilla saatavia signaaleja huomattavasti pienemmiksi, eikä näissäkään havaittu merkittäviä eroja bakteeripitoisuuksien välillä.

Europiumin ja ligandien yhdistelmillä 1, 2, 5 ja 9 saaduista tuloksista on esitetty normalisoitu fluoresenssisignaali bakteeripitoisuuden funktiona kuviossa 5.



Kuvio 5. Eri ligandeista muodostettujen  $\text{EuCl}_3$ -kelaattien vaikutus signaaliin.

Kuviosta nähdään, miten näytteiden eri bakteeripitoisuuksien signaalit erottuvat toisistaan ja taustasta. Mitä enemmän normalisoidut signaalit erottuvat nollanäytteen signaalista, eli mitä pienemmät normalisoidut signaalit ja suhteellinen hajonta ovat, sitä herkempi menetelmä on kyseisessä olosuhteessa. Verrattaessa tutkittujen olosuhteiden signaaleja näytteeseen, jossa on käytetty ligandina NTA:a ja TOPO:a, muiden näytteiden arvot erottuvat huomattavasti vähemmän nollanäytteestä, lukuun ottamatta viimeisen näytteen pienintä bakteeripitoisuutta. Kokonaisuudessaan vertailtaessa näytteiden käyriä keskenään, Eu/NTA/TOPO-olosuhteen signaali laskee tasaisemmin kuin muut. Tämän lisäksi nollanäytteen ja suurimman bakteeripitoisuuden signaalien välinen erotus eli dynaaminen määrittämisalue on laajempi.

Toistettaessa mittaukset kuvion esittämällä olosuhteilla, näytteiden signaalit eivät toistuneet lukuun ottamatta Eu/NTA/TOPO-olosuhdetta, minkä vuoksi optimointia päätettiin jatkaa kyseisillä kelaatin komponenteilla.

## 6.2 Haihdutustavan ja lämpötilan valinta

Näytteiden haihdutusta tutkittiin kolmessa eri lämpötilassa ja tuloksia verrattiin haihduttamattomiin näytteisiin. Haihdutettaessa 37 °C:ssa neste oli täydellisesti haihtunut vasta näytteseoksen valmistusta seuraavana päivänä. Tämän lisäksi signaalit jäivät hyvin mataliksi olettaen, että kelaatin stabiilisuus oli kärsinyt ajan suhteen.

Haihdutettaessa näytteitä lämpökaapissa 76 °C:ssa haihtuminen vei tunnista kolmeen tuntiin riippuen näytekaivojen määrästä. Haihtuminen hidastui useita näytteitä haihduttaessa, ilmeisesti kosteuden noustessa mikrotiitterilevyn läheisyydessä. Nesteen haihduttua näytteitä mitattaessa signaalit olivat korkeampia kuin matalassa lämpötilassa haihdutettujen näytteiden. Tästä huolimatta signaalitasot olivat huomattavasti matalammat kuin haihduttamattomilla näytteillä.

110 °C:ssa haihdutetuista näytteistä neste haihtui noin tunnissa täydellisesti. Mitattaessa näytteitä signaalitasot jäivät merkittävästi haihduttamattomien ja 76 °C:ssa haihdutettujen näytteiden signaaleja matalammalle, eikä muutosta eri bakteeripitoisuuksien välillä havaittu.

Haihdutus korkeimmassa lämpötilassa hylättiin heti, sillä tulos selvästi kärsi käsittelystä. 37 °C:een lämpötilassa haihtuminen vie liikaa aikaa verrattaessa 76 °C:een. Lisäksi 76 °C:een lämpötilassa käsiteltynä näytteiden signaalitasot olivat korkeammat, jolloin signaalien laskeminen ei rajoita kriittisesti mittauksen ajankohtaa.

Haihdutuslämpötilan yhteydessä tutkittiin myös näytteiden kuoppalevyille asettelun vaikutusta signaaliin. Näytteet aseteltiin joko joka kolmanteen kaivoon tai järjestyksessä jokaiseen kaivoon siten, että näytteitä ympäröiviin kaivoihin lisättiin vastaava tilavuus vettä. Jälkimmäisellä ratkaisulla pyrittiin ehkäisemään reunimmaisten kaivojen haihtumista huomattavasti ennen muita. Näytekaivojen ympäröiminen vedellä näytti vaikuttavan reunimmaisten näytteiden signaaliin. Signaalit olivat samansuuruisia muiden rinnakkaisten näytteiden signaalien



kanssa, kun taas aiemmin reunimmaisat signaalit olivat hieman muita matalampia. Tämän vuoksi haihdutus suoritettiin jatkossa näytteet vedellä ympäröiden.

Haihdutuksesta päätettiin kuitenkin luopua kokonaan, sillä näytteet olivat mitattavissa välittömästi valmistuksen jälkeen, jolloin aikaa säästyi. Myös signaalitasot sekä menetelmän dynaaminen määrittäsalue olivat hieman suuremmat haihduttamattomilla näytteillä.

### 6.3 Kuoppalevyn valinta ja mikrosentrifugiputken pinnoituksen vaikutuksen selvittäminen

Optimoinnin tässä osassa tutkittiin kuoppalevyjen ominaisuuksien, kuten non-binding-pinnoitteen ja värin, vaikutusta menetelmän herkkyyteen. Taulukossa 2 on esitettyä tutkitut kuoppalevyt.

Taulukko 2. Käytettyjen kuoppalevyjen tiedot.

|    | Kuoppien lkm | Väri      | Tiedot                           |
|----|--------------|-----------|----------------------------------|
| 1. | 96           | keltainen | Nunc, irtorivit                  |
| 2. |              | väritön   | Nunc, irtorivit                  |
| 3. |              | musta     | Corning Assay plate, non-binding |
| 4. | 384          | musta     | Corning NBS plate, non-binding   |
| 5. |              | musta     | Perkin Elmer, OptiPlate 384-F    |
| 6. |              | musta     | Nunc, Shallow well plate         |
| 7. |              | väritön   | Corning, Thermowell, PCR         |
| 8. |              | valkoinen | Perkin Elmer, OptiPlate          |

Testeistä saatujen tuloksien normalisoituja signaaleja verrattiin keskenään sopivimman kuoppalevyn löytämiseksi. Levyillä 3,4,5,6 ja 7 signaalitasot olivat erittäin matalat, eikä bakteeripitoisuuksien välillä signaaleissa havaittu merkittäviä eroja, joten kyseiset kuoppalevyt hylättiin tarkastelusta.

Levyjen 1 ja 2 signaalitasot olivat eri bakteeripitoisuuksilla suunnilleen samankaltaiset, mutta levyn 1 normalisoidut signaalit eri bakteeripitoisuuksilla erottuivat hieman enemmän nollanäytteestä sekä menetelmän dynaaminen määrittä-

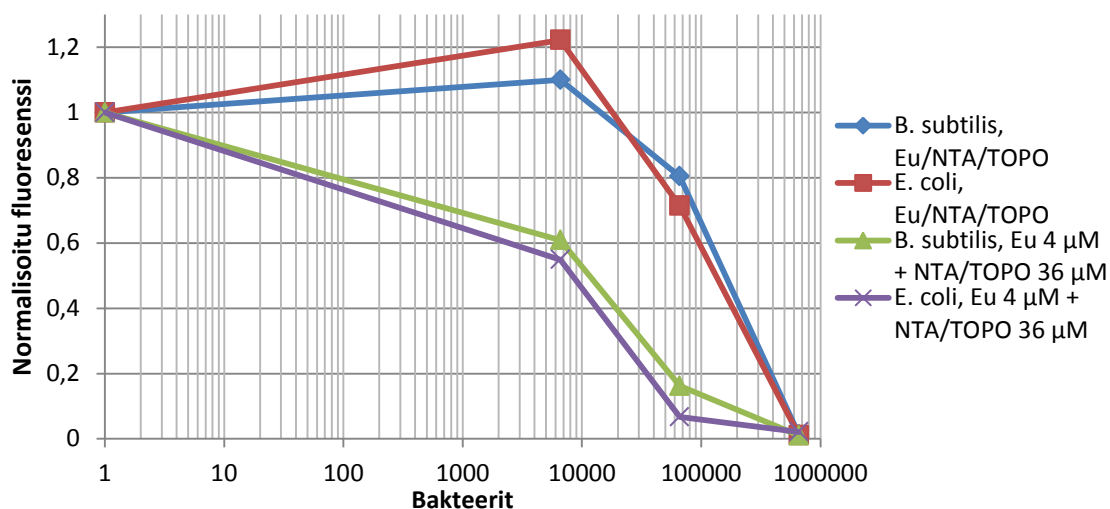
alue oli merkittävästi suurempi. Verrattaessa levyjä 1 ja 8, levyllä 8 dynaaminen määritysalue oli merkittävästi suurempi sekä signaali/tausta-suhdeluvut erottuivat nollanäytteestä huomattavasti enemmän. Tämän vuoksi jatkossa mittaukset suoritettiin Perkin Elmerin valkoisella 384 - OptiPlatella (levy 8). Myöhemmin mittauksia tehtiin myös samalla 96- kuoppalevyllä.

Koska näytteet valmistettiin mikrosentrifugiputkiin, tutkittiin pinnoittamattomien ja tarraamattomien putkien (Sarstedt, low binding microtubes ja Alpha laboratories, no stick microtubes) vaikutusta fluoresenssiin. Oletettavasti putkien pinnoitetta liukeni näytteeseen, sillä saatu signaali oli samantasoinen nollanäytteellä ja eri bakteeripitoisuuksilla. Tästä syystä tutkimuksia jatkettiin pinnoittamattomilla mikrosentrifugiputkillä.

#### 6.4 Lantanidin ja ligandien pitoisuuden sekä lisäystavan vaikutus

Europiumille optimien ligandien löydyttyä tutkittiin yhdistelmän komponenttien pitoisuuksien vaikutusta signaaliin valmistamalla europiumista oma liuoksensa ja ligandeista yksi yhteinen liuos. Pitoisuuksien vaikutusta havainnoitiin molemmilla bakteerilajeilla ja haihduttamattomilla näytteillä. Kappaleessa 5.2.1. Ke-laattien valmistus on mainittu tutkitut europiumin ja ligandien pitoisuudet.

Saatuja tuloksia verrattiin näytteeseen, johon europium, NTA ja TOPO lisättiin yhtenä liuoksena seossuhteella 1:9:9 (pitoisuus europiumin suhteen oli 4  $\mu\text{M}$ ). Testeissä yhdistelmä, jossa europiumin pitoisuus oli 4  $\mu\text{M}$  ja NTA:n sekä TOPO:n pitoisuudet olivat 36  $\mu\text{M}$ , antoi parhaimman tuloksen toistettavasti. Kuviossa 6 on esitettyinä näistä tuloksista käyrät normalisoidut signaalit bakteerilukumäärän funktiona.

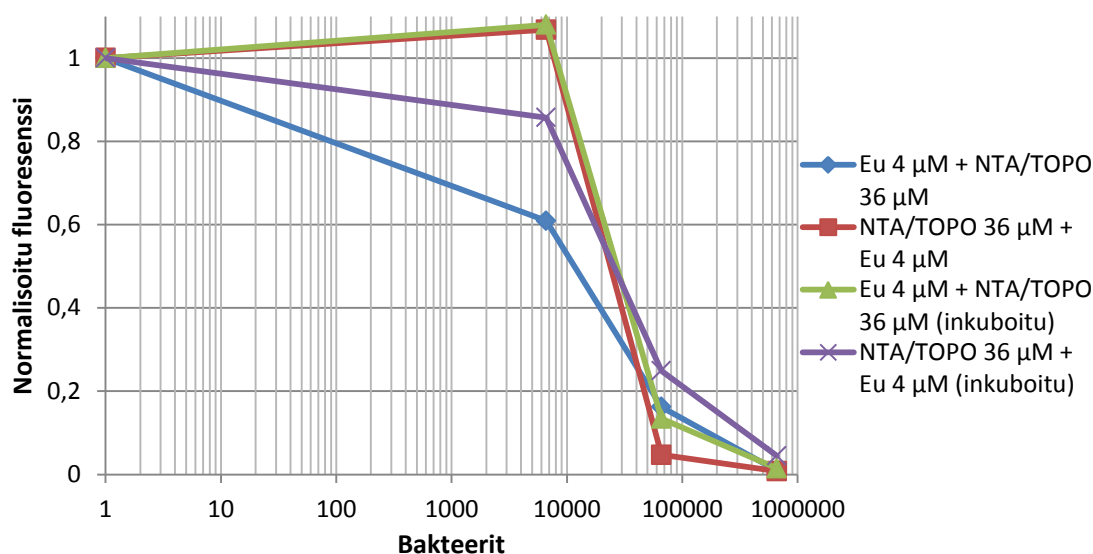


Kuvio 6. Europiumin ja ligandien erillään lisäyksen vaikutus signaaliin.

Kuviosta 6 nähdään, että komponentit erillään lisättäessä matalilla bakteeripitoisuuksilla signaali erottuu selvemmin nollanäytteen signaalista. Tuloksissa kuitenkin suhteellinen hajonta on samaa tasoa erillään ja yhdessä lisätyillä liuoksilla. Tämä viittaa siihen, että pienimmillä pitoisuuksilla menetelmä on herkempi ja pienikin muutos signaalissa on helpommin havaittavissa erillään lisätyillä liuoksilla. Signaalit pysyivät mitattavina noin kaksi tuntia.

Muilla tutkituilla  $\text{EuCl}_3 \cdot n$  ja ligandien pitoisuuksilla signaali ei erottunut taustasta tai se oli korkea, mutta muutoksia bakteerimäärien välillä ei havaittu. Tämän vuoksi jatkossa kelaatti lisättiin näytteisiin erillisinä liuoksina.

Näiden lisäksi selvitettiin kelaattiliuosten lisäysjärjestyksen sekä liuosten lisäysten välissä tehtävän inkuboinnin vaikutusta signaaliin. Inkuboinnin ajaksi valittiin kaksi tuntia, sillä sinä aikana samaan aikaan lisätyissä näytteissä signaali oli ehtinyt tasaantua.



Kuvio 7. Kelaatin komponenttien lisäysjärjestyksen ja inkuboinnin vaikutus signaaliin.

Kuviosta 7 käy ilmi, että  $\text{EuCl}_3$ :a ensin lisättäessä normalisoitu signaali erottuu pienimmällä bakteeripitoisuudella eniten nollanäytteen signaalista. Myös tuloksien suhteelliset hajonnat olivat pienimpiä, joten se on kyseisellä alueella herkin kuvion olosuhteista. Muihin kuvion olosuhteisiin verrattuna muita merkittäviä eroja ei ole, myös dynaamiset määrittämisalueet ovat olosuhteilla samanlaajuisia. Merkittäviä eroja inkuboitujen ja inkuboimattomien näytteiden välillä ei ollut. Kuitenkin kahden tunnin inkubointiajan lisäksi signaalin kesti noin 1,5 tuntia nousta maksimiinsa, jolloin saatiin parhaimmat tulokset. Inkubointia ei jatkossa suoritettu, sillä tämä vaihe lisäsi mittaukseen kuluvaan aikaan huomattavasti. Tutkimuksia jatkettiin edelleen lisäämällä näytteisiin ensin 4  $\mu$ M  $\text{EuCl}_3$  ja sitten 36  $\mu$ M NTA/TOPO-liuos.

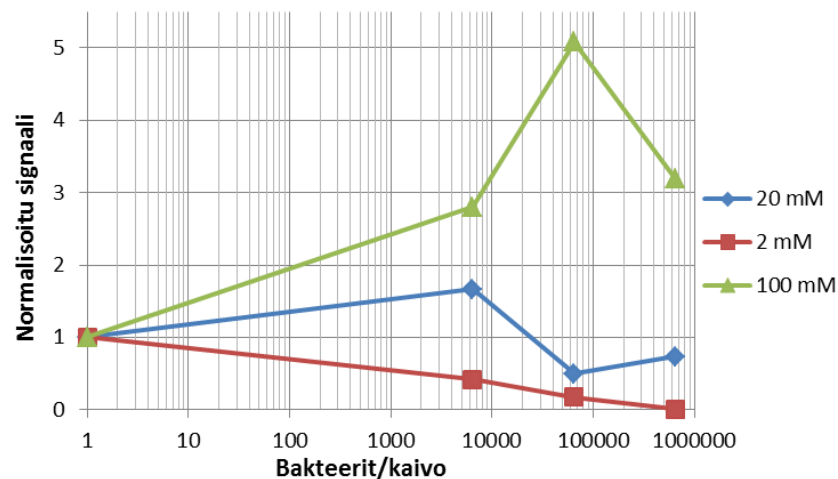
## 6.5 Näytepuskurin valinta

Näytepuskureita tutkittaessa havainnoitiin seitsemän eri puskurin ja niiden pH:n vaikutusta signaaliin molemmilla bakteerilajeilla. Nämä puskurit on lueteltu kapaleessa 5.2.4. Puskurit ja suolan lisäys.

Vaikutuksia havainnoitaessa tuloksia verrattiin 20 mM Tris-puskurin (pH 7,8) tuloksiin. Kaikilla tutkituilla puskureilla, pH:sta riippumatta, signaalitasot jäivät hyvin mataliksi, eikä bakteeripitoisuuksien välillä havaittu merkittäviä eroja. Poikkeuksena oli MQ-vesi, jolla signaalitasot olivat aluksi korkeammat, mutta laskivat nopeasti näytteen valmistuksen jälkeen. Tämän vuoksi tutkimuksia jatkettiin Tris-puskurissa, jolle selvitettiin seuraavaksi sopiva pH ja pitoisuus.

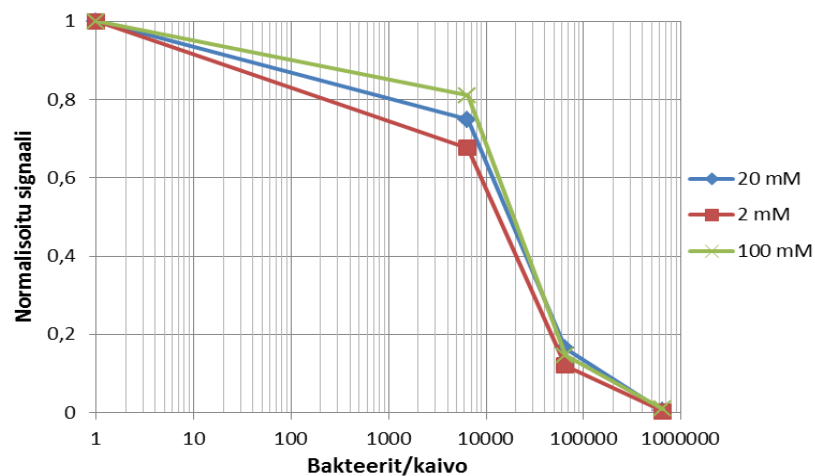
Tutkituista kolmesta pH:sta (7,8; 5,9 ja 4,5) pH 7,8 ja 4,5 toimivat suunnilleen samalla tavalla 20 mM pitoisuudessa. pH:ssa 5,9 dynaaminen alue oli suppeampi kuin kahdella muulla. pH:ssa 4,5 dynaaminen alue oli yhtä laaja kuin pH:ssa 7,8. pH:ssa 7,8 ja 4,5 puskurin normalisoidut signaalit eivät myöskään poikenneet huomattavasti toisistaan, joten kummallekin puskurin pH-arvolle selvitettiin sopiva pitoisuus.

Puskurin molemmilla pH-arvoilla tutkittiin 2, 20 ja 100 mM pitoisuuksien vaikutus. 2 mM puskurin dynaaminen alue oli pH:ssa 4,5 huomattavasti laajempi kuin 20 mM:lla. Kuviosta 8 nähdään 2 mM puskurissa eri bakteeripitoisuuksien normalisoitujen signaalien erottuvan enemmän nollanäytteestä ja laskevan tasaisemmin bakteeripitoisuuksien funktiona kuin 20 mM puskurin. 100 mM puskurissa signaalin käyrä kääntyi nousevaksi. Dynaaminen alue jäi tällä pitoisuudella suppeaksi, mutta nollanäytteen ja matalimman bakteeripitoisuuden signaalien suhde on suuri.



Kuvio 8. Puskurin pitoisuuksien vaikutus signaaliin pH:ssa 4,5.

pH:ssa 7,8 20 mM puskuriin verrattuna 100 mM puskurissa eri bakteeripitoisuuksien fluoresenssit olivat suunnilleen samat, mutta kuviosta 9 nähdään normalisoitujen signaalien erottuva hieman vähemmän nollanäytteestä. 2 mM pitoisuudella dynaaminen määrittäsalue oli huomattavasti laajempi ja normalisoidut signaalit erottuivat enemmän kuin 20 mM puskurissa. Tämän vuoksi pH:ssa 7,8 tutkittiin vielä 0,6 mM; 0,2 mM ja 0,06 mM pitoisuudet. Kaikissa kolmessa pitoisuudessa dynaamiset mitta-alueet olivat suppeammat kuin 2 mM:ssa. Myös normalisoidut signaalit erottuivat vähemmän ja suhteelliset hajonnat olivat suuremmat verrattuna 2 mM pitoisuuteen.



Kuvio 9. Puskurin pitoisuuden vaikutus signaaliin pH:ssa 7,8.

Optimointia jatkettiin seuraavaksi tutkimalla suolan lisäyksen vaikutusta kahdella pitoisuudella ja pH-arvolla: 2 mM, pH 7,8 sekä 100 mM, pH 4,5.

Molemmilla puskurin pH-arvoilla tutkittiin 30 ja 300 mM NaCl-pitoisuuden vaikutusta signaaliin. pH:ssa 4,5 suurempi suolapitoisuus sai aikaan laajemman dynaamisen mittausalueen, suuremmat nollanäytteen ja matalimpien bakteeripitoisuuksien signaalien suhteet verrattaessa pienempään suolapitoisuuteen. pH:ssa 7,8 pienempi suolapitoisuus vaikutti tuloksiin samoin kuin pH:ssa 4,5 suurempi pitoisuus suolaa. Vertailtaessa molempien pH-arvojen parhaita tuloksia keskenään pH:ssa 7,8 signaalit olivat korkeammat ja dynaaminen mittausalue huomattavasti laajempi, mutta pH:ssa 4,5 fosfaatin vaikutus signaaliin näytti olevan pienempi, joten näytepuskurin pH:ksi valittiin 4,5 ja NaCl lisättiin näytteeseen 300 mM:ksi.

## 6.6 Kuolleiden solujen havaitseminen

Menetelmää tutkittiin myös UV-valolla käsitellyillä soluilla, jolloin tulokset osoittivat signaalien ja variaatiokertoimien olevan samansuuruiset kuin elävillä soluilla. Testissä käytettiin Tris-puskuria (pH 7,8), 4  $\mu$ M  $\text{EuCl}_3$ :a ja 36  $\mu$ M NTA/TOPO-liuosta. Bakteerien viabiliteetti määritettiin maljaamalla käsittelemätöntä ja UV-valolla käsiteltyä suspensiota TSB-agarille. Inkuboinnin jälkeen pesäkkeet laskettiin ja tulokset osoittivat viabiliteetin olleen 24 %. Tästä päätellen menetelmällä pystytään havaitsemaan niin elävät kuin kuolleetkin bakteerit.

## 6.7 Liuottimien ja kasvatusmediumin vaikutus menetelmän herkkyyteen

Aluksi liuotinten (DMSO, etyleeniglykoli, polyetyleeniglykoli eli PEG400, glyseroli) vaikutusta menetelmän herkkyyteen tutkittiin lisäämällä näytteisiin 8 % liuotinta. Kaikkien liuotinten lisäys vaikutti tuloksiin laskien signaalitasoja, mutta samalla eri bakteeripitoisuuksien normalisoidut signaalit erottuivat enemmän nollanäytteestä verrattuna näytteisiin ilman liuotinta. Parhaimmaksi liuottimeksi osoittautui polyetyleeniglykoli PEG400. Toistettaessa mittauksia polyetyleenigly-

kolilla, signaalitasot olivat edelleen matalat, mutta normalisoitujen signaalien ja variaatiokertoimien osalta tulos ei toistunut.

Myös kelaatin lisäystä liuottimissa tutkittiin seuraavissa olosuhteissa:

- Tris-puskuri + bakteerit + 10 µl Eu/NTA/TOPO (4 µM) DMSO:ssa (vertailukohde)
- Tris-puskuri + bakteerit + 2 µl Eu/NTA/TOPO (20 µM) DMSO:ssa
- Tris-puskuri + bakteerit + 10 µl Eu/NTA/TOPO (4 µM) PEG400:ssa
- Tris-puskuri + bakteerit + 10 µl Eu/NTA/TOPO (4 µM) MQ-vedessä

Toisessa olosuhteessa signaalialue oli suppeampi ensimmäiseen verrattuna ja normalisoidut signaalit erottuivat nollanäytteestä vähemmän. Kelaattia PEG400:ssa lisättäessä signaalialue oli suunnilleen sama kuin ensimmäisessä näytteessä, mutta muutokset pienillä bakteeripitoisuuksilla olivat heikot, mikä huononsi myös herkkyyttä. Vedessä lisättäessä signaalitasot olivat huomattavasti muita näytteitä korkeammat, mutta muutokset pienillä bakteeripitoisuuksilla ja herkkyys olivat huonommat. Kyseisten testien perusteella liuottimien lisäyksestä päätettiin luopua, tosin kelaattiliuos valmistettiin yhä laimentamalla DMSO:hon.

Mediumin vaikutusta havainnoitaessa osoittautui jo pienimmän (0,01 %) pitoisuuden vaikuttavan negatiivisesti menetelmän herkkyyteen. Mitä enemmän näytteessä oli mediumia, sitä enemmän signaalitasot laskivat ja herkkyys kärsi. Tästä päätellen näytteisiin lisättävät bakteerisuspensiot tulee pestä mahdollisesta kasvatusmediumista menetelmää käytettäessä.

## 6.8 Puskurin fosfaattipitoisuuden optimointi

Erityisesti fosfaattia sisältävien puskureiden ja liuosten vaikutusta tutkittiin, sillä fosfaatin todettiin vaikuttavan signaaliin. Etenkin kelaatin  $\text{EuCl}_3$ - ja ligandiliuokset erillään pidettäessä fosfaatti voi sitoutua europiumiin estäen ligandien sitoutumisen, jolloin  $\text{Eu}^{3+}$  ei virity ja signaalia ei saada.



Näytteissä kuitenkin  $\text{EuCl}_3$ :n sitoutuminen bakteerien pinnalle näyttäisi suojaavan  $\text{Eu}^{3+}$ :a fosfaatin sitoutumiselta, mikä näyttäisi olevan pääosassa menetelmän toimivuudessa. Tämän lisäksi bakteerit tarvitsevat fosfaattia DNA:n/RNA:n ja soluseinämän fosfolipidien sekä ATP:n rakennusaineeksi <sup>24,25</sup>, jolloin ne voivat ottaa solun ulkopuolisesta liuoksesta fosfaattia sisäänsä. Bakteerien käyttäessä fosfaattia näytteen fosfaattipitoisuus laskee, jolloin fosfaatin ja ligandien välinen kilpailu sitoutumisesta europiumin pinnalle vähenee.

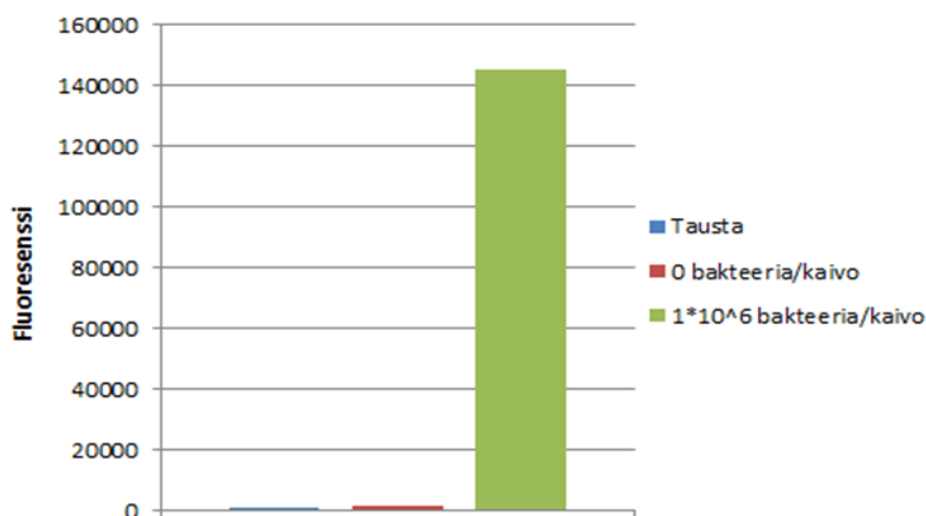
Fosfaatin määrä optimoitiin lisäämällä Tris-puskuriin valmistettuihin näytteisiin 0; 0,06; 0,2; 0,5; 0,6; 1,6; 6; 16 tai 48 % 1x PBS:ä näytteen tilavuudesta. 1x PBS:n määrän lisääntyessä normalisoidut signaalit kasvoivat. Menetelmän dynaaminen alue oli kuitenkin korkeammissa 1x PBS-pitoisuuksissa suppeampi. Pitoisuuden noustessa variaatiokertoimet nousivat muutaman prosentin, joten merkittävää muutosta ei tapahtunut. Fosfaatti-pitoisuuden noustessa näytteiden signaalit laskivat ajan suhteen enemmän kuin fosfaatittomien näytteiden signaalit.

Tulokset osoittivat, että suuremman kuin 20 µl tilavuuden lisääminen näytteisiin ei parantanut menetelmän herkkyyttä. Tämän vuoksi jatkossa fosfaatin lisäystä hyödynnettäessä 1x PBS:ä lisättiin näytteisiin 20 µl, jolloin sen lopullinen pitoisuus näytteessä oli 6 %.

Verrattaessa 96-levyllä ja 384-levyllä saatuja tuloksia keskenään, 384-levyllä normalisoidut signaalit olivat erottuivat taustasta paremmin kuin 96-levyllä ja näytteiden variaatiokertoimet olivat suuremmat useimmilla bakteeripitoisuuksilla.

## 6.9 Europiumin ja ligandien vuorovaikutus bakteerien kanssa

Kelaatin sitoutumista tutkittaessa havaittiin molempien  $\text{EuCl}_3$ :n ja ligandien vuorovaikuttavan bakteerien kanssa.  $\text{EuCl}_3$ :n vuorovaikutusta tutkittaessa näytteitä pestiin neljä kertaa sentrifugoimalla ja pelletti suspensoitiin puskuriin, minkä jälkeen suspensoitua näytettä laimennettiin EFI-liuokseen ja mitattiin fluoresenssi. Kuviossa 10 on esitetty mittauksen tulokset fluoresenssina.



Kuvio 10. Näytteiden ja taustan fluoresenssien ero.

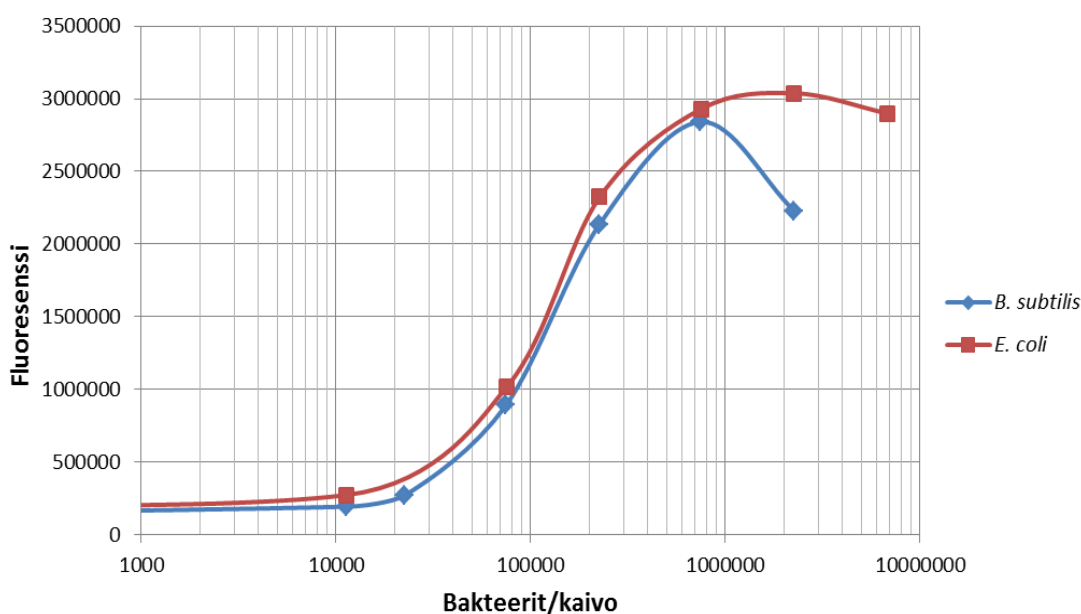
Kuviosta 10 nähdään, että europiumin ja bakteerien välillä on vuorovaikutusta sillä signaali on korkea verrattuna EFI-liuoksen taustasignaaliin sekä näytteeseen, jossa ei ollut bakteereita. Jos vuorovaikutusta ei olisi, viimeisen näytteen signaali olisi samansuuruinen kuin taustasignaali.

NTA:n sitoutumista tutkittaessa valmistettiin näytteet kahdella eri tavalla. Ensimmäiseen näytteeseen lisättiin ligandit ensin ja europium lisättiin vasta sentrifugoinnin jälkeen supernatanttiin, kun taas toisessa näytteessä lisäysjärjestys oli päinvastainen. Tulokset osoittivat signaalin olevan korkeampi näytteessä, johon ligandit lisättiin ensin, joten supernatanttiin on jäänyt enemmän sitoutumattomia ligandeja. Tämä osoittaa  $\text{Eu}^{3+}$ :n ja bakteerien vuorovaikutuksen olevan vahvempaa kuin ligandien ja bakteerien.

## 6.10 Menetelmän herkkyuden määrittäminen

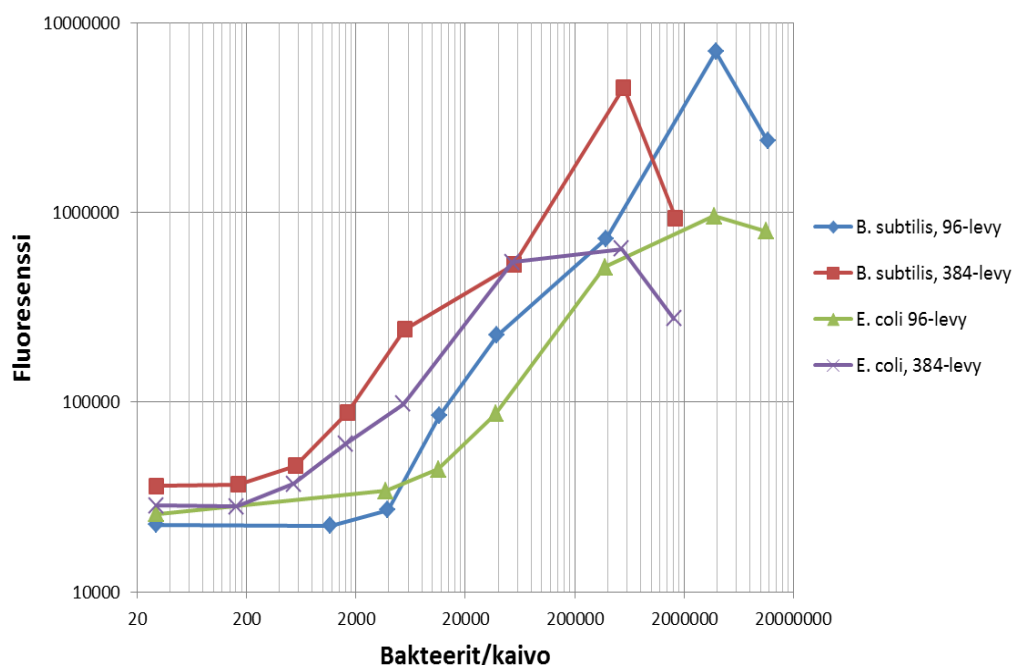
Sopivien olosuhteiden löydyttyä molemmille bakteereille määritettiin kalibraatiokäyrät kahdella eri olosuhteella. Ensimmäisessä olosuhteessa käytettiin 100 mM Tris-puskuria (pH 5), johon oli lisätty natriumkloridia 300 mM pitoisuudeksi. Toisessa olosuhteessa hyödynnettiin fosfaattia lisäämällä 2 mM Tris-puskuriin (pH 7,8) 1x PBS:ä 6 %:ksi näytteen kokonaistilavuuden suhteen.

Kuvio 11 osoittaa 2 mM Tris-puskurissa määritettyjen, molempien bakteerien, kalibraatiokäyrien yhtenevyyden. Käyrästä on määritetty menetelmän herkkyysdeksi *B. subtilis* 3 000 bakteeria ja *E. coli* 4000 bakteeria. Herkkyys laskettiin käyttämällä keskihajontaa (STD) bakteerien nollapitoisuudella. Herkkyys vastasi bakteerien lukumäärää, jolla signaali oli 3\*STD korkeampi kuin signaali bakteerien nollapitoisuudella. Kummallakin bakteerilajilla dynaaminen määrittämisalue on noin 2,5 dekadia. Tässä olosuhteessa kalibraatiokäyrät määritettiin 70 µl näytetilavuudella ja näytteiden variaatiokertoimet vaihtelivat 1 % ja 7 % välillä.



Kuvio 11. Kalibraatiokäyrät bakteereille fosfaatittomassa olosuhteessa.

Kuviossa 12 on esitettyä molemmille bakteereille määritetyt kalibraatiokäyrät, kun näytepuskuriin on lisätty fosfaattia 6 %. Lisäksi herkkyys määritettiin kahdella erikokoisella levyllä.



Kuvio 12. Kalibraatiokäyrät bakteereille fosfaattia sisältävissä olosuhteissa.

Kuvion käyristä on määritetty menetelmän herkkyudeksi *B. subtilis* 96-levyllä 4 000 bakteeria ja 384-levyllä 700 bakteeria. *E. coli* herkkyys oli 96-levyllä 5 000 bakteeria ja 384-levyllä 600 bakteeria. Kummallakin bakteerilajilla molemmissa näytetilavuuksissa dynaaminen määrittäminen oli noin kolme dekadia. Herkkyys laskettiin käyttämällä keskihajontaa (STD) bakteerien nollapitoisuudella. Herkkyys vastasi bakteerien lukumäärää, jolla signaali oli 3\*STD korkeampi kuin signaali bakteerien nollapitoisuudella. Arvoista nähdään, että herkkyys vaihtelee huomattavasti näytetilavuudesta riippuen, pienemmän näytetilavuuden ollessa merkittävästi herkempi. 96-kuoppalevyllä näytetilavuus oli 70 µl ja variaatiokertoimet olivat keskimäärin 10 % *B. subtilis* ja 8 % *E. coli*. 384-kuoppalevyllä näytetilavuus oli 10 µl ja variaatiokertoimet olivat keskimäärin 12 % *B. subtilis* ja 9 % *E. coli*.

## 7 PÄÄTELMÄT

Kehitetyn menetelmän kummankaan olosuhteen herkkyydet eivät yllä aivan kaupallisten ATP-määritysten tasolle, joilla voidaan havaita jopa yksittäisiä soluja. Menetelmä soveltuu kuitenkin suurempien bakteerimäärien havainnointiin, kuten viljelmien bakteerimäärien määrittämiseen. Menetelmää voitaisiin mahdollisesti myös käyttää esimerkiksi pulloitetujen juomavesien bakteeripitoisuuksien tutkimiseen. Etelä-Suomen Sanomien toimesta suoritettujen tutkimusten mukaan pullovesien bakteeripitoisuudet voivat olla jopa 27 000 pesäkettä/ml ja Evi-ra suosittelee pakattujen pullovesien toimenpiderajaksi 50 000 pesäkettä/ml.<sup>26</sup> Bakteeripitoisuuksien ollessa näin suuret, menetelmä soveltuisi pullovesien analyysiin. Ennen analyysijä on myös mahdollista konsentroida näytevesi, mikä parantaa menetelmän soveltuvuutta kyseiseen tarkoitukseen.

Joidenkin kaupallisten analyysien suorittamiseksi vaaditaan laitteita, jotka eivät yleisesti kuulu laboratorioden vakiolaitteistoon. Mikrotiitterilevylukijan sen sijaan voisi nykypäivänä olettaa olevan yleinen laite laboratorioissa, joten menetelmää käytettäessä suuria investointeja laitteeseen ei synny. Myös analyysiin käytettävien reagenssien hinnat ovat edullisia, sillä analyysissä käytettiin epästabiileja kelaatteja.

Matalien kustannusten lisäksi menetelmää on helppo ja nopea käyttää myös suurten näytemäärien kanssa. Reagenssiliuosten valmistaminen ei vaadi liuotuksen lisäksi ylimääräisiä vaiheita ja samoja varastoliuoksia voidaan käyttää eri näytteseosten valmistamiseen. Nämä valmiit liuokset myös säilyvät huoneenlämmössä useita kuukausia käyttökelpoisina. Useiden näytteiden analysointi onnistuu samanaikaisesti yhdellä mikrotiitterilevyllä. Menetelmä ei myöskään vaadi reagenssien pesua mikrotiitterilevylle pipetoinnin jälkeen. Bakteerit kuitenkin tulee pestä mahdollisesta kasvatusmediumista ennen analyysia.

Kokonaisuudessaan kehitetyllä menetelmällä näytteiden valmistus ja analysointi on nopeaa, riippuen kuitenkin näytteiden määrästä. Ennen jokaista analyysia ei tarvitse valmistaa uusia kelaattiliuoksia niiden säilyvyyden ansiosta, mikä sääs-

tää aikaa. Menetelmä ei myöskään vaadi inkubointeja tai näytteen temperointia ja näytteet ovat valmiita analysoitavaksi välittömästi valmistuksen jälkeen. Valmistetun näyteseoksensignaali pysyy stabiilina vähintään 30 minuuttia, minkä ansiosta näytteiden välitön analysointi ei ole kriittistä tulosten kannalta.

Tulevaisuudessa voisi kehityksen kohteena olla menetelmän toimivuuden selvittäminen pinnoilla biofilmien havainnoinnissa, jolloin voitaisiin korvata nykyiset monimutkaiset ja aikaa vievät menetelmät. Biofilmien havainnointiin käytettävät menetelmät vaativat esimerkiksi reagenssien lisäyksen jälkeen pesuvaiheita ja värjäysmenetelmillä voidaan havainnoida vain elävät tai kuolleet solut, joten tarvitaan kaksi eri menetelmää ja mittausta. Biofilmien analysoinnissa tarvitaan myös menetelmä itse biofilmin matriksin, bakteerien tuottamien polysakkaridien ja muiden metaboliatuotteiden, havaitsemiseksi. Jos menetelmällä havaittaisiin myös muutokset bakteereja ympäröivässä matriksissa, se voisi korvata nämä kolme eri mittausta.<sup>27</sup>

## 8 YHTEENVETO

Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää lantanidikelaatin epäspesifiseen sitoutumiseen ja aikaerotteiseen luminesenssiin perustuva bakteerien kvantitointimenetelmä. Bakteeripitoisuuksien määrittämiseen käytettiin ensisijaisesti absorbanssimittausta. Tuloksia tarkasteltaessa havainnoitiin useiden eri olosuhteiden vaikutusta signaaliin.

Menetelmää kehitettäessä testattiin useita  $\text{EuCl}_3$ :lle sopivia ligandeja sekä  $\text{TbCl}_3$ :a ja kolmea sille soveltuvaa ligandia. Kelaatin komponenttien valinnan lisäksi lantanidin ja ligandien eri pitoisuuksien vaikutusta signaaliin tutkittiin. Tuloksista havaittiin  $\text{EuCl}_3$ :n ja sen ligandeista NTA:n ja TOPO:n toimivan parhaiten,  $\text{EuCl}_3$ :n pitoisuuden ollessa  $4 \mu\text{M}$  ja ligandien  $36 \mu\text{M}$ .  $\text{EuCl}_3$ - ja ligandiliuoksia lisättiin molempia erikseen näytepuskuriin 3 % sen tilavuudesta. Saadut tulokset osoittivat juuri  $\text{EuCl}_3$ :n vuorovaikuttavan bakteerien kanssa. Ligandien ja bakteerien välillä vuorovaikutus oli myös havaittavissa, mutta se oli merkittävästi heikompaa kuin  $\text{EuCl}_3$ :n. Testistä saatu tulos on yhteneväinen useiden  $\text{EuCl}_3$ -kelaattiin kohdistuvien tutkimusten tulosten kanssa.

Tutkimuksessa optimaalisimmaksi puskuriksi osoittautui Tris-puskuri. Olosuhteissa, joissa näytteeseen ei lisätty fosfaattia, 100 mM pitoisuus, pH 5 ja 300 mM NaCl antoivat parhaimman tuloksen. Fosfaatin lisäystä hyödynnettäessä puskurin optimipitoisuudeksi osoittautui 2 mM ja pH:ksi 8.

Tutkimuksen aikana havaittiin liuottimien ja kasvatusmediumin häiritsevän menetelmää, joten mahdollisesti menetelmää bakteeriviljelmien kasvun havainnointiin käytettäessä, bakteerit tulee pestä ennen analyysia.

Menetelmän herkkyudet määritettiin kahdella eri olosuhteella ja kahdessa näytetilavuudessa. Fosfaatin lisäystä hyödynnettäessä herkkyudet  $70 \mu\text{l}$ :n näytetilavuudessa olivat samansuuruiset kuin fosfaatittomassa olosuhteessa. Menetelmä oli herkimmillään määritettäessä bakteeripitoisuuksia  $10 \mu\text{l}$ :n näytetilavuudessa.

della fosfaatin lisäystä hyödyntäen, jolloin pienin havaittu bakteeripitoisuus oli 600 bakteeria.

Tavoitteet nopeasta ja yksinkertaisesta menetelmästä toteutuivat, mutta menetelmän herkkyys ei yllä ATP-määrityksen tasolle, jolla voidaan havaita yksittäinen bakteeri. Menetelmä soveltuu kuitenkin esimerkiksi bakteeriviljelmien seurantaan tai pullotettujen juomavesien laadunvalvontaan liittyviin bakteeripitoisuuksien määrityksiin, jolloin menetelmän käytettävyyden parantamiseksi analysoitavat näytteet voidaan konsentroida ennen mittauksia. Jatkossa menetelmää voitaisiin myös kehittää biofilmien analysointiin soveltuvaksi.



## LÄHTEET

- <sup>1</sup> Hemmilä, I.A., 1991. Applications of fluorescence in immunoassays. ss. 51-55, 107-109, 139-145, 205. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- <sup>2</sup> Lakowicz, J. R., 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3. painos, ss.1-5, 14. Springer Science + Business Media, LLC: New York, NY
- <sup>3</sup> Kenkel, J. (2003) Analytical chemistry for technicians. 3. painos. ss. 216-218. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida
- <sup>4</sup> Seery, M., 2012. The photochemistry portal. Viitattu 1.3.2012 <http://photochemistryportal.net/home/index.php/category/principles/>
- <sup>5</sup> Ormerod, M.G., 2008. Flow cytometry – A basic introduction, luku 3. Viitattu 5.3.2013, [http://flowbook.denovosoftware.com/Flow\\_Book](http://flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book)
- <sup>6</sup> Boa, A.N., The Bacterial Cell Wall, University of Hull, Department of Chemistry, Module 06763, Semester 2, s. 2. Viitattu 18.2.2013, <http://www.hull.ac.uk/php/chsanb/LMWeb/BacterialMembranes.pdf>
- <sup>7</sup> Heino, J., Vuento, M., 2010, Biokemian ja solubiologian perusteet. 2. painos, s. 80. WSOYpro Oy, Porvoo, Suomi.
- <sup>8</sup> Todar, K., 2008-2012. Todar's Online Textbook of Bacteriology, Structure and Function of Bacterial Cells. Viitattu 18.2.2013, [http://www.textbookofbacteriology.net/structure\\_5.html](http://www.textbookofbacteriology.net/structure_5.html)
- <sup>9</sup> Bacterial enumeration, Western Washington University, Biology Department. Viitattu 17.2.2013, [http://fire.biol.wwu.edu/brodham/biol346\\_S07/labman\\_week4.pdf](http://fire.biol.wwu.edu/brodham/biol346_S07/labman_week4.pdf)
- <sup>10</sup> Coulter, W. H. (1953) Means for Counting Particles Suspended in a Fluid. US Patent Number US2656508
- <sup>11</sup> Beckman Coulter A, 2000-2013, The Coulter Principle. Viitattu 28.3.2013 <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/industrial/particle-technologies/coulter-principle/index.htm>
- <sup>12</sup> Kubitschek, H. E. & Fiske, J. A., 1986. Determination of Bacterial Cell Volume with the Coulter Counter. J. Bacteriol., 168: 1466–1467.
- <sup>13</sup> Beckman Coulter B, 2000-2013, Coulter Counter Analyzers, Tuote- ja menetelmäkuvaus. Viitattu 28.2.2013 <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/industrial/products/coulter-counter-analyzers/index.htm>
- <sup>14</sup> Adler, C.P., 1975, Relationship between deoxyribonucleic acid content and nucleoli in human heart muscle cells and estimation of cell number during cardiac growth and hyperfunction. Recent Adv. Stud. Cardiac. Struct. Metab. 8, s. 373
- <sup>15</sup> Jones, L. J., Gray, M., Haugland, R. P. & Singer, V. L., Yue, S.T., 2001, Sensitive Determination of Cell Number Using the CyQUANT Cell Proliferation Assay, J. Immunol. Methods, 254: 85–98
- <sup>16</sup> BioTek, Application Note, Quantitation of DNA using Hoechst 33258. Viitattu 22.2.2013, [www.biotek.com/resources/docs/FL600\\_Quantitation\\_DNA\\_Using\\_Hoechst\\_33258.pdf](http://www.biotek.com/resources/docs/FL600_Quantitation_DNA_Using_Hoechst_33258.pdf)

- 
- <sup>17</sup> Adams, C.J., Storrie, B., 1981, A Simple DNA-dependent Fluorescence Enhancement Assay for Cell Number. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 326–328.
- <sup>18</sup> Jansen, R.S., Rosing, H., Beijnen, J.H., Schellens, J., 2009, Protein versus DNA as a marker for peripheral blood mononuclear cell counting. *Anal. Bioanal. Chem.* 395(3): 863-867.
- <sup>19</sup> Campbell, A. K., 1988, *Chemiluminescence – Principles and Applications in Biology and Medicine*, Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, luku 5, 267–282.
- <sup>20</sup> DeLuca, M., McElroy, W.D., 1978, Purification and Properties of Firefly Luciferase. *Methods in Enzymology*, 57: 3-15
- <sup>21</sup> Branchini, B.R., 2008, Firefly Bioluminescence. Viitattu 29.4.2013 <http://www.photobiology.info/Branchini.htm>
- <sup>22</sup> Corning, Microplate Selection Guide for Assays and Drug Discovery: 23-24. Viitattu 12.2.2013, [http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/productselectionguide\\_microplates11\\_02\\_cls\\_mp\\_014.pdf](http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/productselectionguide_microplates11_02_cls_mp_014.pdf)
- <sup>23</sup> PerkinElmer, DELFIA enhancement solution, tuotetiedot 5/2000, s. 1. Viitattu 13.2.2013, [http://www.perkinelmer.com/FI/CMSResources/Images/44-73325DTS\\_DELFIAEnhancementSolution40010010.pdf](http://www.perkinelmer.com/FI/CMSResources/Images/44-73325DTS_DELFIAEnhancementSolution40010010.pdf)
- <sup>24</sup> Bergwitz, C., Jüppner, H., 2011, Phosphate sensing, *Adv Chronic Kidney Dis.* 18(2): 132.
- <sup>25</sup> Moore, D.V., Hypophosphatemia in Emergency Medicine. Viitattu 16.2.2013, <http://emedicine.medscape.com/article/767955-overview>
- <sup>26</sup> LahtiAqua, Sininen kulta päihittää pullovedet, 22.3.2009. Viitattu 29.4.2013, [www.lahtiaqua.fi/folders/Files/artikkelit/ess%2022.3.09%20vesi.pdf](http://www.lahtiaqua.fi/folders/Files/artikkelit/ess%2022.3.09%20vesi.pdf)
- <sup>27</sup> Fallarero, A., Skogman, M.E., Vuorela, P.M., 2012, Combining biofilm matrix measurements with biomass and viability assays in susceptibility assessments of antimicrobials against *Staphylococcus aureus* biofilms. *The Journal of Antibiotics*, 65(9): 453-459.